Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Thiorhodaceae; Wasserstoff-Donatoren und Sulfatreduktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Hans Hermann Thiele
aus Dinslaken

Göttingen 1966

Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Thiorhodaceae; Wasserstoff-Donatoren und Sulfatreduktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Hans Hermann Thiele
aus Dinslaken

Göttingen 1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Diese Arbeit wurde im
Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen
durchgeführt.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel
Korreferent: Prof. Dr. Trebst
Tag d. mündl. Prüf.: 16. 12. 66

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	4
	1) Die Bakterienstämme	4
	2) Nährlösung für die Substratverwertung	5
	3) Nährlösung für die Wachstumsversuche mit H_2 und die Assimilation von $^{35}SO_4$	8
	4) Reinheit der Kulturen	9
	5) Thunbergtest	9
	6) Katalasenachweis	1o
	7) Nitritnachweis	1o
	8) Wachstum mit Sulfat als einziger Schwefelquelle	1o
	9) Proteinbestimmung an ganzen Zellen	1o
	1o) Proteinbestimmung im zellfreien Extrakt	11
	11) Phaeophytinbestimmung	11
	12) Präparation von Bacteriophaeophytin	12
	13) Beurteilung des Wachstums bei der Substratverwertung	12
	14) Versuchsanordnung für die Wachstumsversuche mit H_2 und die Assimilation von $^{35}SO_4$	15
	15) Radioaktivitätsmessung ^{35}S-markierter Zellen	15
	16) Trübungsmessung als Maß für das Wachstum	17
	17) Chromatographische Methoden	17
	a) Papierchromatographie radioaktiver Aminosäuren	17
	b) Papierchromatographie von Nucleotiden	18
	c) Dünnschichtchromatographie von Nucleotiden	18
	d) Trennung von Nucleotiden durch Hochspannungselektrophorese	18

Seite

e) Herstellung von Radioautogrammen und Radiogrammen 19
18) Manometrische Messungen 19
19) Chemikalien 19
2o) Herstellung zellfreier Extrakte 2o
21) Bestimmung von Enzymaktivitäten 2o

III. Experimente und Ergebnisse

A. Wachstum mit verschiedenen anorganischen und organischen Verbindungen als H-Donatoren 24
1) Anorganische und organische Schwefelverbindungen 26
2) Zucker 27
3) Alkohole 3o
4) Fettsäuren 32
5) Organische Säuren 34
a) Säuren des TCC 34
b) andere organische Säuren 34
6) Pepton, Caseinhydrolysat und Glutamat 35
7) Verwertung verschiedener Stickstoffquellen 37
8) Prüfung auf Nitritanhäufung 39
9) Hydrogenase und Katalase 39
1o) Vitamin B_{12}-Bedürfnis 39

B. Die Thiorhodaceen-Gattungen und ihre Substrat-Spektren 4o
1) Thiocapsa 4o
2) Chromatium- und Thiocystisgruppe 42
3) Rhodothece 44
4) Chromatium warmingii 45
5) Chromatium weissei und Chr. okenii 45

Seite

C. Assimilatorische Sulfatreduktion und Enzyme des Schwefelstoffwechsels 47

1) Wachstum mit H_2 bei verschiedenen Schwefelquellen 48
2) Wachstum mit Sulfat als einziger Schwefelquelle 49
3) Assimilation von $^{35}SO_4$ mit H_2 als H-Donator 5o
4) Hydrolyse ^{35}S-markierter Zellen 56
5) Assimilation von $^{35}SO_4$ mit Acetat als H-Donator 59
6) Nachweis von APS-Reduktase 66
7) Versuche zum Nachweis von Sulfit-Oxidase 75
8) Nachweis von ADP-Sulfurylase 77
9) Versuche zum Nachweis von ATP-Sulfurylase 79

IV. Diskussion 83

V. Zusammenfassung 97

VI. Literaturverzeichnis 99

VII. Anhang

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosin-5-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
Chr.	Chromatium
cpm	Impulse pro Minute
dest.	destilliert
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
konz. (conz.)	konzentriert
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Mbl	Methylenblau
mE	Millieinheiten
MK	Myokinase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
nm	Nanometer
P_a	anorganisches Phosphat
PAP	3-Phospho-adenosin-phosphat
PAPS	3-Phospho-adenosin-5-phosphosulfat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGK	Phospho-glycerat-kinase
3-PG	3-Phospho-glycerin
PK	Pyruvatkinase
PP_a	Pyrophosphat
spec.	Species
St.	Stamm
Tab.	Tabelle
TCC	Tricarbonsäurezyklus
TES	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0011

I. Einleitung

> Der Kreislauf des Schwefels in der Natur bewegt sich in der Hauptsache zwischen Sulfaten, Schwefelwasserstoff und Sulfiden, elementarem Schwefel und Schwefel in organischen Verbindungen. Soweit Mikroorganismen beim Übergang der einen in die andere Form beteiligt sind, handelt es sich teils um unspezifische Vorgänge, teils um die Tätigkeit von Spezialisten.
>
> Schwartz (1958)

Zu den Spezialisten des Schwefelkreislaufs gehören im wesentlichen zwei Gruppen von Organismen, deren Wirksamkeit sich vor allem im anorganischen Teil des Schwefelkreislaufs in oxidativen und reduktiven Prozessen zeigt, die sich zwischen den Sauerstoffverbindungen des Schwefels, elementarem Schwefel und Schwefelwasserstoff abspielen. An diesen Umsetzungen sind die farblosen, grünen und roten „Schwefelbakterien" und die Desulfurikanten beteiligt.
Die farblosen, chemoautotrophen Thiobacilli und Beggiatoa-Arten, sowie die grünen und roten Schwefelbakterien oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen. Die Energie zur Reduktion von Kohlendioxid gewinnen die farblosen Arten durch Oxidation der Schwefelverbindungen im Dunkeln mit Sauerstoff zu Sulfat. Die chlorophyllhaltigen Organismen oxidieren Schwefelwasserstoff im Zuge der Photosynthese unter anaeroben Bedingungen.
VAN NIEL (1932) konnte zeigen, daß Thiorhodaceae sich

im Licht in einem rein anorganischen Nährmedium mit Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle und Sulfid als Wasserstoffdonator und Schwefelquelle anaerob entwickeln. Durch quantitative Bestimmung der umgesetzten Stoffe konnte VAN NIEL (1941) das Wesen der bakteriellen Photosynthese aufklären. Der Vergleich mit der Photosynthese der grünen Pflanzen führte dann zur Aufstellung einer allgemeinen Gleichung für die Photosynthese. Wachsen die Thiorhodaceae autotroph mit Sulfid, so kann vorübergehend elementarer Schwefel in Granula intrazellular gespeichert werden. Ist das Sulfid des Nährmediums erschöpft, so wird der gespeicherte Schwefel zu Sulfat weiteroxidiert. Über die enzymatischen Reaktionen bei diesen oxidativen Prozessen ist bisher wenig bekannt.

Auch Tiere sind in der Lage reduzierte Schwefelverbindungen zu oxidieren. So untersuchten BAXTER et al. (1958) die Oxidation von Sulfid in Geweben der Ratte, die enzymatische Oxidation von Sulfit durch Sulfit-Oxidase wurde von HEINBERG et al. (1953) mit Extrakten aus Hundeleber untersucht. Die Tiere sind aber nicht befähigt, Sulfat auf die Stufe von Sulfid zu reduzieren. Zur Deckung ihres Bedarfs an reduzierten Schwefelverbindungen sind sie auf die Bereitstellung dieser Verbindungen durch Pflanzen und Bakterien angewiesen.

Eine kleine Gruppe von Bakterien nutzt Sulfat als Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung. Das Sulfat wird dabei auf die Stufe von Sulfid reduziert und ausgeschieden. In Analogie zu den „dissimilatorischen Nitratreduzierern" werden diese Organismen „dissimilatorische Sulfatreduzierer genannt. Desulfovibrio desulfuricans und Clostridium nigrificans sind die typischen Vertreter dieser Gruppe. Die meisten heterotrophen Bakterien können auch Sulfat reduzieren. Der Schwefel erscheint dabei aber nicht als Sulfid im Nährmedium,

sondern wird lediglich in Zellsubstanzen eingebaut und durch andere Reaktionen wieder in den Schwefelkreislauf zurückgeführt. Dieser geringe Umsatz und Einbau in die schwefelhaltigen, organischen Verbindungen wird wieder in Analogie zum Nitratstoffwechsel „assimilatorische Sulfatreduktion" genannt. Die Frage, ob der enzymologische Weg bei der Reduktion von Sulfat der gleiche ist wie bei der Oxidation von Sulfid und ob diese Reaktionen bei den verschiedenen physiologischen Typen gleich sind, ist von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurde versucht, weitere Einblicke in die Stoffwechselvorgänge der Thiorhodaceae, eine Gruppe der photosynthetischen Bakterien, die bisher wenig untersucht worden ist, zu gewinnen.

II. Material und Methoden

1) Die Bakterienstämme

Zu allen Untersuchungen wurden Reinkulturen der von Prof. Dr. N. Pfennig isolierten Stämme verwendet. Es wurden folgende Stämme untersucht:

Genus	Stamm	Stamm-nummer
Chromatium okenii	Zeulenroda	1811
Chromatium weissei	Tassajara	6211
Chromatium weissei	Zeulenroda	1812
Chromatium warmingii	Ostrau	1113
Chromatium warmingii	Melbourne	6512
Chromatium warmingii	Klein-Kalden	1311
Chromatium spec.	Reyershausen	1211
Chromatium spec.	Pacific Grove	6411
Chromatium spec.	Pacific Grove	6412
Chromatium spec.	Lüneburg	1611
Chromatium spec.	Klein-Kalden	1312
Chromatium spec.	Göttingen	2811
Thiocystis spec.	Klein-Kalden	1313
Thiocystis spec.	Millport	2311
Thiocystis spec.	Carmel River	6111
Thiocystis spec.	Grüneplan	2711
Rhodothece pendens	Klein-Kalden	1314
Rhodothece conspicua	Davis	6611
Thiocapsa floridana	Gilroy Hot Spring	6311
Thiocapsa floridana	Hardenberg	1711
Thiocapsa floridana	Zeulenroda	1813
Thiocapsa floridana	Davis	6612

Zum Vergleich:

Chromatium spec. Stamm D (international)
Thiopedia spec.[1)]

2) Nährlösung für die Substratverwertung

Die zu prüfenden Stämme wurden in einer nach PFENNIG (1961,1965) modifizierten Nährlösung kultiviert.

Lösung I.

bidestilliertes Wasser	4.ooo ml
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	2,o g

Diese 4 Liter Lösung werden in je 33,5 ml-Portionen in 5o ml Schraubverschlußflaschen mit Aluminiumdeckel und Gummidichtung (ca. 12o Flaschen) abgefüllt und im Autoklaven bei 121° 3o Minuten sterilisiert. Der Schraubdeckel wird vor dem Sterilisieren mit einer halben Umdrehung aufgeschraubt. Nach Entnahme der Flaschen aus dem Autoklaven werden sie über Nacht auf 4° abgekühlt. Der Deckel darf zum Druckausgleich nicht fest aufgeschraubt werden.
In einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben wird eine Lösung von o,25 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ in 5oo ml bidestilliertem Wasser zum Nachfüllen der Flaschen sterilisiert.

Lösung II.

bidestilliertes Wasser	1oo ml
Schwermetallösung[2)]	6o ml

1) Dieser Stamm wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. J. Lascelles zur Verfügung gestellt.

$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	2,o g
KCl	2,o g
KH_2PO_4	2,o g

Lösung III.

bidestilliertes Wasser	1.8oo ml
$NaHCO_3$	9,o g

Die Lösung III wird mindestens 3o Minuten unter magnetischer Rührung mit CO_2-Gas durchströmt.
Nach Sättigung der Lösung III mit CO_2 wird die Lösung II hinzugegeben und die Mischung sofort unter CO_2-Druck (1,5 Atm) durch ein Seitz-Filter (Sorte EKS, Größe 6) filtriert, und die sterile Lösung in je 17 ml-Portionen zu der gekühlten $CaCl_2$-Lösung gegeben.

Lösung IV.

bidestilliertes Wasser	4oo ml
$Na_2S \times 9\ H_2O$	9,o g

Diese Lösung wird in einem 1 Ltr.-Erlenmeyerkolben mit einem Stabmagneten sterilisiert. Nach Abkühlung wird diese Lösung auf einem Magnetrührer durch tropfenweise Zugabe einer sterilen 2M H_2SO_4-Lösung teilweise neutralisiert, so daß nach Zugabe von 2,5 ml dieser Lösung je Flasche ein End-pH von 6,8 bis 7,5 erreicht wird.
Die Flaschen werden dann mit steriler $CaCl_2$-Lösung aufgefüllt, so daß eine kleine Luftblase zum Druckausgleich

---

2) Für einige Versuche wurde eine Schwermetallösung nach PFENNIG (1961) benutzt, die aber durch eine vereinfachte und verbesserte, wie unten beschrieben, ersetzt wurde.

bleibt und fest verschlossen.
Die frisch hergestellte Nährlösung ist durch die Oxidation von H_2S zu Schwefel durch gelösten Sauerstoff etwas getrübt. Nach 1 bis 2 Tagen verschwindet diese Trübung und es bildet sich ein dunkeles Sediment. Nach dieser Alterung sind die Flaschen gebrauchsfertig.

Schwermetallösung

bidestilliertes Wasser	1.ooo ml
EDTA	5oo mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	2oo mg
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	1o mg
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	3 mg
H_3BO_3	3o mg
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	2o mg
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	1 mg
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	2 mg
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	3 mg

Vitamin B_{12}-Lösung

Vitamin B_{12} (=Cyanocobalamin) 2 mg/1oo ml dest.H_2O

Stammlösungen der Testsubstanzen

Die zu prüfenden Substrate wurden in einer 5%igen (bzw. 2,5%igen) Lösung angesetzt und sterilisiert. Von den Säuren wurden die Ammoniumsalze verwendet, um den pH-Wert in der Kulturlösung möglichst konstant zu halten. Da die Grundnährlösung ohne Ammoniumchlorid angesetzt wurde, dienten die Ammoniumsalze der Säuren gleichzeitig als Stickstoffquelle. Zu den Stammlösungen

der übrigen Substrate wurde 1,7% NH_4Cl zugesetzt. Die Lösungen wurden bei 121° 3o Minuten sterilisiert, oder steril filtriert (Seitz-Filter). Die Substrate wurden den Kulturlösungen in einer Endkonzentration von o,1% (bzw. o,o5%) zugesetzt.

Schwefelsuspension

1o g Schwefelblüte wurden in 1oo ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt und zur Benetzung mit Ultraschall behandelt, danach an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei 8o° 3o Minuten pasteurisiert.

Folgende Substanzen wurden jeweils frisch angesetzt und steril filtriert:
Thioglycolat, Ascorbat, Pyruvat und Ketoglutarat.

3) Nährlösung für die Wachstumsversuche mit H_2 und die Assimilation von $^{35}SO_4$

Grundnährlösung

pro 1 Liter destilliertem Wasser:
Schwermetallösung, 1o ml; Vitamin B_{12}-Lösung, 1 ml; $CaCl_2x2H_2O$, o,35 g; NH_4-Acetat, 1,o g; $MgSO_4x7H_2O$, o,35 g; KCl, o,35 g; KH_2PO_4, o,35 g; $NaHCO_3$, 1,5 g; Na-Ascorbat, o,5 g.
Die Lösung wird durch Seitz-Filtration (Filter EKS) in Schraubverschlußflaschen abgefüllt.

Für die Versuche mit H_2 wurde NH_4-Acetat durch o,35 g NH_4Cl ersetzt und die Konzentration von $NaHCO_3$, auf 1,o g herabgesetzt. Die sterile Nährlösung wurde in die

weiter unten beschriebenen Kulturgefäße abgefüllt. Die Gasphase enthielt 9o% H_2 und 1o% CO_2. Unter diesen Bedingungen wurde ein pH-Wert von 6,8 - 6,9 erreicht.

Zusätze

L(-)-Methionin 3o mg (bzw. 25o mg) pro 1 Liter Nährlösung
Cystein 3o mg pro 1 Liter Nährlösung.

4) Reinheit der Kulturen

Jede Kultur wurde mikroskopisch, mit Difco AC-Medium und mit Desulfovibrio-Medium auf Reinheit geprüft.

5) Thunbergtest

Eine sulfidgewachsene Kultur (5o ml) wurde abzentrifugiert, einmal in $CaCl_2$-Lösung und einmal in Puffer gewaschen, danach in 1o ml einer vereinfachten Nährlösung aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 2 ml zum Test eingesetzt. Der Aufsatz des Gefäßes enthielt 1 ml Methylenblau-Lösung (5 mg Mbl/ 1oo ml H_2O). Die Röhrchen wurden zweimal evakuiert und mit H_2-Gas gefüllt. Als Kontrolle dienten Röhrchen mit Stickstoffüllung. Inkubiert wurden diese Ansätze 3o Minuten bei 22° im Licht und im Dunkeln.
Bei Hydrogenase-positiven Organismen trat in dieser Zeit eine Entfärbung des Methylenblaus ein.

Vereinfachte Nährlösung

$CaCl_2x2H_2O$	1,o g
Schwermetallösung	25 ml
$MgCl_2x6H_2O$	o,5 g

NH_4Cl	o,5 g
KCl	o,5 g
KH_2PO_4	o,5 g
NaCl	2,3 g
dest. H_2O	1.475 ml
pH	6,75

6) Katalasenachweis

Es wurde zu diesem Test ein Teil der unter 5) beschriebenen Suspension abzentrifugiert und das Überstehende dekantiert. Zum Satz wurde 3%ige H_2O_2-Lösung gegeben. Aufsteigende Blasen zeigten Sauerstoffentwicklung an.

7) Nitritnachweis

Für diesen Test wurden aus Kulturen mit Nitratzusatz und Kontrollkulturen ohne Nitrat in Abständen von mehreren Tagen je ein Tropfen Kulturlösung entnommen und auf einer Tüpfelplatte mit einem Reagenz nach Griess-Ilosvay auf Nitrit geprüft.

8) Wachstum mit Sulfat als einziger Schwefelquelle

Zu diesem Test wurde das Nährmedium wie folgt variiert:
$MgCl_2x6H_2O$ wurde durch $MgSO_4$,
NH_4Cl durch NH_4-Acetat (o,1%)und
Na_2Sx9H_2O durch Na-Ascorbat (o,1%) ersetzt.
Als Kontrollen dienten Kulturen mit Sulfid.

9) Proteinbestimmung an ganzen Zellen

Der Proteingehalt ganzer Zellen wurde mit einer von SCHMIDT (1963) nach LA RIVIERE (1958) modifizierten Methode bestimmt. 4 ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert und zweimal mit je 3 ml 96%igem Äthanol extra-

hiert. Der Alkohol wurde dekantiert, die Zellen in 4 ml Wasser aufgeschwemmt. Dann wurde o,4 ml 16%ige NaOH zugefügt und 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Es wurde rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt, dann 1,6 ml Biuretreagenz hinzugegeben, umgeschüttelt und 3o min bei 37° inkubiert. Dann wurde abzentrifugiert und die Extinktion des klaren Überstehenden in einer 2-cm-Küvette bei 546 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt. Unter diesen Bedingungen entsprachen 1,2o mg Rinderserum-albumin pro Ansatz einer Extinktion von o,1.

1o) Proteinbestimmung im zellfreien Extrakt

Der Proteingehalt zellfreier Extrakte wurde mit dem oben beschriebenen Reagenz nach SCHMIDT bestimmt. o,1 ml des zu untersuchenden Extraktes wurden mit o,75 ml Wasser und o,15 ml 3M Trichloressigsäure versetzt und 5 min bei 3.ooo U/min zentrifugiert. Das Überstehende wurde möglichst restlos abgegossen und der Satz zweimal mit je 3ml konz. Aceton extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde in 3,9 ml Wasser aufgenommen, o,4 ml 16%ige NaOH und 1,6 ml Biuretreagenz zugefügt. Darauf wurde gut durchmischt und 3o min bei 37° inkubiert. Die Extinktion wurde in 2-cm-Küvetten bei 546 nm gegen eine Nullprobe bestimmt.

11) Phaeophytinbestimmung

Ein aliquoter Teil der Kulturen wurde abzentrifugiert, gewaschen und in o,5 ml Wasser suspendiert, dann wurden 4,5 ml einer Lösung von o,o3M H_3PO_4 in Methanol zugesetzt, 3o min extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 76o nm in einer 1-cm-Küvette gemessen. Die angegebene Zeit muß genau eingehalten werden, da das Phaeophytin in dieser Lösung nicht stabil ist.

12) Präparation von Bacteriophaeophytin

Für die Präparation von Bacteriophaeophytin wurde Chromatium spec. Stamm 6411 gewählt. Dieser Stamm wurde in sulfidhaltiger Nährlösung kultiviert.

Arbeitsgang

2,5 Liter Kulturlösung wurden abzentrifugiert (4.000U/min, 30 min), das Sediment wurde zweimal in 250 ml PO_4-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Das Bacteriochlorophyll wurde mit 250 ml Methanol extrahiert. Dem Methanolextrakt wurden dann 7,5 ml konz. HCl und 125 ml CCl_4 zugesetzt. Diese Lösung wurde mit je 2 Liter Wasser mehrmals gewaschen und die Phasen getrennt. Die CCl_4-Phase wurde über Nacht mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und anschließend filtriert, dann im Wasserbad (30^o) unter vermindertem Druck eingeengt und der Rest des CCl_4 in einem Glasschälchen verdunstet. Der Rückstand von Bacteriophaeophytin wurde eingewogen und in Methanol oder CCl_4 gelöst. Zur Prüfung auf Reinheit wurde ein Spektrum aufgenommen. Außerdem wurde eine Eichkurve (760 nm) aufgestellt. 100 µg Phaeophytin pro Ansatz entsprechen einer Extinktion von 1,05.

13) Beurteilung des Wachstums bei der Substratverwertung

Das Wachstum einer Kultur wurde gegen eine „Kontrolle" mit 0,075% Sulfid abgeschätzt. In Zweifelsfällen wurde eine Phaeophytin- oder Proteinbestimmung durchgeführt.

Zeichenerklärung

\- = kein erhöhtes Wachstum im Vergleich zur „Kontrolle" mit 0,075% Sulfid

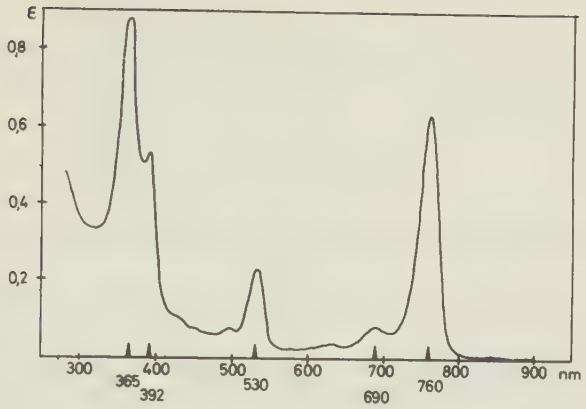

Abb. 1 Absorptionsspektrum von Bacteriophaeophytin gelöst in Tetrachlorkohlenstoff

Zellen von Chromatium Stamm 6411 wurden mit Methanol extrahiert. Dem Extrakt wurden HCl und CCl_4 zugesetzt. Diese Lösung wurde mit Wasser mehrmals gewaschen und die Phasen getrennt. CCl_4 wurde verdunstet und der Rückstand von Bacteriophaeophytin in CCl_4 gelöst. Die Messung dieser Lösung erfolgte in einer 1-cm-Küvette im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in Schritten von 5 nm.

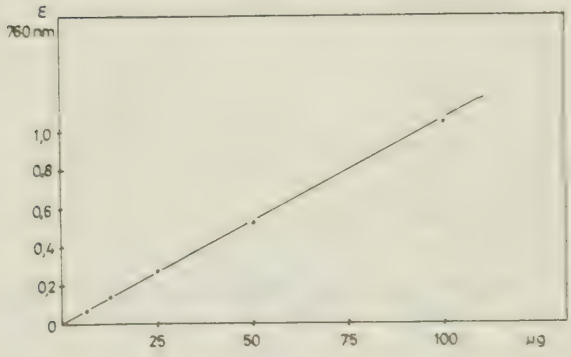

Abb. 2 Eichkurve für die photometrische Bestimmung von Bacteriophaeophytin in CCl_4 gelöst

Durchführung der Messung wie bei Abb. 1, jedoch bei konstanter Wellenlänge von 760 nm und verschiedenen Konzentrationen. Es wurden 100 µg Phäophytin in 3 ml CCl_4 gelöst. Eine Extinktion von 0,100 entspricht 9,0 µg/Ansatz.

(+) = schwache Förderung des Wachstums gegenüber der Kontrolle
\+ = gutes Wachstum
++ = sehr gutes Wachstum
(H) = leichte Hemmung des Wachstums gegenüber der Kontrolle
H = Hemmung des Wachstums
HH = Kulturen nicht angewachsen

14) Versuchsanordnung für die Wachstumsversuche mit H_2 und die Assimilation von $^{35}SO_4$

Für die Wachstumsversuche mit molekularem Wasserstoff als Wasserstoffdonator und dem Einbau von radioaktivem Schwefel aus $^{35}SO_4$ wurde der in Abb. 3 dargestellte Versuchsaufbau gewählt.

15) Radioaktivitätsmessung ^{35}S-markierter Zellen

Die Radioaktivität ganzer Zellen wurde auf Membranfiltern (Gruppe 6, Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen) nach der von SCHLEGEL und LAFFERTY (1961) ausgearbeiteten Methode gemessen.Das auf eine Glasfritte aufgezogene Filter wurde nach TRÜPER (1964) mit ca. 3 ml destilliertem Wasser gewaschen, anschließend wurde die Probe auf das Filter gegeben, abgesaugt und mit verdünnter H_2SO_4 gewaschen. Das Filter wurde auf einen Messingblock aufgezogen und unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die Radioaktivität der Zellen wurde mit dem Zählgerät FH 49, dem Probenwechsler FH 448 und dem Zeitdrucker FH 449 der Firma Friesecke & Hoepfner, Erlangen, gemessen.
Die Radioaktivität von $Na_2{}^{35}SO_4$ wurde mit einem Endfensterzählrohr an Proben, die auf Aluminiumplättchen

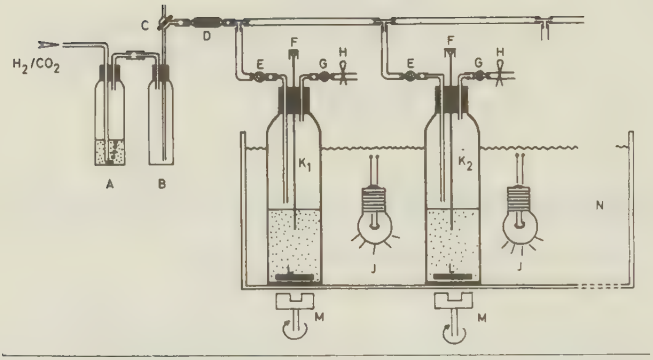

Abb. 3 Versuchsanordnung für Wachstumsversuche mit molekularem Wasserstoff und den Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat in wachsende Zellen

A: Waschflasche mit Wasser, B: Waschflasche zum Druckausgleich, C: Dreiwegehahn, D: Wattefilter, E: Olive mit Platinasbest, F: Injektionskanüle mit Gummikappe zur Entnahme von Proben, G: Olive mit Watte, H: Schlauchklemme, J: Glühbirne, K_1,K_2,...: 250 ml Jenaer-Glasflaschen als Kulturgefäße, L: in Teflon eingeschmolzene Magnetstäbe, M: motorisch angetriebene Hufeisenmagnete, N: thermokonstantes Wasserbad

aufgedampft waren, bestimmt.

16) Trübungsmessung als Maß für das Wachstum

Die Trübung wurde im Spektral-Photometer PMQ II der Firma Zeiss, Göttingen (d=1 cm, 650 nm) an geeignet verdünnten, schwefelfreien Suspensionen gemessen.

17) Chromatographische Methoden

a) Papierchromatographie radioaktiver Aminosäuren

Die ^{35}S-markierten Zellen wurden abzentrifugiert, in Puffer gewaschen, zweimal mit Methanol (80%ig) extrahiert, um schwefelhaltige Intermediärprodukte und die Pigmente zu entfernen.
Ein Teil der Zellen wurde mit Wasserstoffperoxid und Molybdat als Katalysator nach DENT (1948) behandelt. Hierbei werden Methionin zu Methioninsulfon und Cyst(e)in zu Cysteinsäure oxidiert. Die so behandelten Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen, in 6N HCl aufgenommen und im zugeschmolzenen Röhrchen 24 Stunden bei 105° hydrolysiert. Der Rückstand wurde abzentrifugiert und das Hydrolysat im Exsiccator über P_2O_5 und KOH 4mal zur Trockne eingeengt. Zur Chromatographie wurde der Rückstand in Propanol (10%ig) aufgenommen.
Die Auftrennung der Hydrolysate erfolgte durch absteigende Chromatographie auf dem Papier 2043 a gewaschen der Firma Schleicher & Schüll, Einbeck. Es wurde gegen Faserrichtung mit n-Propanol: Ammoniak: Wasser (6:3:1) nach METZNER (1962) und HIRSCH (1963) chromatographiert. Es wurde mit Ninhydrin (0,2% in n-Butanol) besprüht und bei 60° entwickelt. Die durch Radioautogramme (siehe unter Abschn. e) sichtbar gemachten Flecken wurden durch Cochromatographie identifiziert.

b) Papierchromatographie von Nucleotiden

Für die papierchromatographische Trennung von Nucleotiden aus dem Testansatz für ATP-Sulfurylase wurden aliquote Teile durch Erhitzen im kochenden Wasserbad oder durch Trichloressigsäure und anschließende Zentrifugation enteiweißt. Die proteinfreien Lösungen wurden nach Neutralisation der Trichloressigsäure direkt auf Papier aufgetragen. Es wurde das Papier S&S 2043 a gewaschen (Firma Schleicher & Schüll, Einbeck) gewählt. Es wurden die Lösungsmittelsysteme nach GÖRLACH et al.: n-Butanol: n-Propanol: Ammoniak: Wasser (7:5:7:2) und nach BURROWS et al.: Aceton: 2o%ige TES (9:3) (siehe: HAIS u. MACEK, 1963) aufsteigend verwendet. Die Flecken wurden in der Regel durch Ultraviolettlicht der Wellenlänge 25o bis 26o nm nachgewiesen. Außerdem wurde zum Nachweis das Molybdän-Reagenz nach HANES u. ISHERWOOD (siehe: HAIS u. MACEK, 1963) benutzt.

c) Dünnschichtchromatographie von Nucleotiden

Nach STAHL (1962) lassen sich Nucleotide durch Dünnschicht-Chromatographie an Ionenaustauscher-Schichten trennen. Es wurde DEAE-Cellulose (o,2 mm Schichtdicke, MN 3ooG/DEAE der Firma Machery & Nagel, Düren) mit Gipszusatz verwendet. Als Fließmittel diente o,o2N HCl im offenen Tank. Nachweismethoden: siehe unter b).

d) Trennung von Nucleotiden durch Hochspannungselektrophorese

Nucleotide wurden nach der Enteiweißung des Testansatzes durch Hochspannungselektrophorese (Pherograph nach Wieland und Pfleiderer der Firma Hormuth, Heidelberg-Wiesloch) auf Whatman-Papier Nr. 1 mit o,1M

Ammonium-Acetat-Puffer (pH 5,6) 4 Stunden mit 25 V/cm getrennt. Der Nachweis der Nucleotide erfolgte wie unter b) beschrieben.

e) Herstellung von Radioautogrammen und Radiogrammen

Für die Herstellung von Radioautogrammen wurden die Chromatogramme 1 bis 2 Wochen mit Agfa-Röntgenfilm Sino M in direkten Kontakt gebracht und danach entwickelt. Zur Herstellung von Radiogrammen wurden von den Chromatogrammen Streifen von 4 cm Breite abgeschnitten und im Radiochromatographen FH 452 mit Registriergerät FH 585 und dem Zählgerät FH 49 mit Integrator (der Firma Friesecke & Hoepfner, Erlangen) ausgewertet.

18) Manometrische Messungen

Zu den Warburg-Versuchen wurde ein Rundwarburg der Firma Braun, Melsungen, benutzt. Die Schüttelfrequenz des Gerätes betrug 120 Hin- und Hergänge pro Minute, die Amplitude war 4 cm. Das Bad hatte eine Temperatur von 30°. Es wurden zweiarmige Warburgstandartgefäße mit einem Volumen von 15 $\pm$ 1 ml verwendet. Zur Herstellung anaerober Bedingungen wurden die Gefäße mit O_2-freiem Stickstoff mindestens 10 Minuten begast.

19) Chemikalien

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien verwendet. Die Biochemikalien waren Präparate der Firma Boehringer, Mannheim. Gereinigte Pyrophosphatase wurde von der Firma Calbiochem, Luzern, Schweiz, geliefert. Das radioaktive Sulfat stammte vom Radiochemical Centre, Amersham, England.

2o) Herstellung zellfreier Extrakte

Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend in einigen ml Puffer angerührt. Von dieser Suspension wurde durch Ultraschall (Hochfrequenzgenerator und Desintegrator der Firma Schöller & Co., Frankfurt) bei o^{o}-5^{o} ein Rohextrakt hergestellt. Je nach Stamm wurde 3-6 Minuten mit 6oW/ml beschallt. Der Rohextrakt wurde in einer Christ-Omikron-Zentrifuge bei o^{o} und 3o.ooo U/min (entsprechend 1oo.ooo xg) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach Bestimmung des Proteingehaltes zum Test eingesetzt.

21) Bestimmung von Enzymaktivitäten

Eine Einheit (E) der spezifischen Aktivität ist definiert als ein µmol Substratumsatz/ min/ mg Protein. Entsprechend ist eine Millieinheit der tausendste Teil. Die optischen Tests wurden bei Zimmertemperatur im Eppendorf-Photometer und, falls notwendig, im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Registriergerät durchgeführt.

Adenosin-5-phosphosulfat-Reduktase; Optischer Test nach PECK et al. (1965)

Ansatz: 3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 4 µmol $K_3Fe(CN)_6$; 1o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 1o µmol AMP; Rohextrakt; Endvolumen 3,o ml.
Gemessen wurde die Absorption von $K_3Fe(CN)_6$ bei 42o nm.

Sulfit-Oxidase; Warburg-Test nach FRIDOVICH und HANDLER (1956)

Die Warburggefäße enthielten im Hauptraum:
25o µmol Tris-Puffer pH=8,o; Rohextrakt.
Der Seitenarm enthielt:
2o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA;
Gesamtvolumen 2,o ml; Gasphase: Luft; Temperatur: 37°.

Sulfit-Oxidase; Optischer Test
nach HEIMBERG et al. (1953)

Die Thunbergküvette enthielt im Hauptraum:
2oo µmol Tris-Puffer pH=7,8; o,1 µmol Methylenblau;
Rohextrakt.
Der Seitenarm enthielt:
2o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA.
Gesamtvolumen: 3,o ml; Gasphase: Stickstoff (reinst).
Gemessen wird die Absorption von Methylenblau bei 65o nm.

Adenosin-di-phosphat-Sulfurylase

Ansatz: 3oo µmol Tris-Puffer pH=7,6; 3o µmol AMP;
3o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 12 µmol $K_3Fe(CN)_6$;
3o µmol PO_4^{3-}; Rohextrakt; Endvolumen 3,o ml.

Es wurden in Zeitabständen Proben entnommen und der
Gehalt an ADP bestimmt (Boehringer Test-Satz ADP/AMP).

Der ADP/AMP Test-Satz enthielt:
1M Triäthanolamin-Puffer pH=7,6; 1,3M K_2CO_3;
$1x1o^{-2}$M PEP; 1,3M KCl; o,4M $MgSO_4$; $5x1o^{-3}$M NADH;
LDH (1 mg/ml); PK (1 mg/ml); MK (2 mg/ml).
Gemessen wurde die Absorption von NAD bei 366 nm.

Adenosin-tri-phosphat-Sulfurylase I

Ansatz: 3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 3o µmol AMP

3o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 12 µmol $K_3Fe(CN)_6$; 4o µmol $MgCl_2$; 3o µmol $Na_4P_2O_7$; Rohextrakt; Endvolumen 3,o ml.

Es wurden in Zeitabständen Proben entnommen und der Gehalt an ATP bestimmt (Boehringer Test-Satz ATP).

Der ATP Test-Satz enthielt:
o,1M Triäthanolamin-Puffer pH=7,6; $4x1o^{-3}$M $MgSO_4$; $6x1o^{-3}$M 3-PG; $1,2x1o^{-2}$M NADH; GAPDH (4 mg/ml); PGK (1 mg/ml).
Gemessen wurde die Absorption von NAD bei 366 nm.

Adenosin-tri-phosphat-Sulfurylase II

Modifiziert nach WILSON und BANDURSKI (1958).

Ansatz: 3oo µmol Tris-Puffer pH= 7,5; 3o µmol ATP; 3o µmol Na_2MoO_4; 6 µmol $MgCl_2$; 2 µmol EDTA; Rohextrakt; Endvolumen: 3,o ml; Inkubation 12o min bei $3o^{o}$.

Es wurden in Zeitabständen Proben entnommen und der Gehalt an AMP bestimmt (Boehringer Test-Satz ADP/AMP). Außerdem wurde Pyrophosphat nach Hydrolyse durch einen Extrakt von Aspergillus oryzae oder gereinigte Pyrophosphatase als anorganisches Phosphat nach FIESKE und SUBBAROW (1925) oder PIRSON und KUHL (1958) bestimmt.

Adenosin-tri-phosphatase

Ansatz: 3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 2o µmol ATP; 2o µmol $MgCl_2$; Pyrophosphatase o,5 bis 1,o mg; Rohextrakt; Endvolumen 3,o ml.

Es wurden in Zeitabständen Proben entnommen und der

Gehalt an anorganischem Phosphat, wie im vorigen Test beschrieben, bestimmt.

Pyrophosphatase

Ansatz: 2oo µmol Tris-Puffer pH=7,4; 9 µmol $Na_4P_2O_7$; 2o µmol $MgCl_2$; Rohextrakt; Endvolumen 3,o ml.

Bestimmt wird anorganisches Phosphat.

III. Experimente und Ergebnisse

A. Wachstum mit verschiedenen anorganischen und organischen Verbindungen als Wasserstoff-Donatoren

Alle bisher in Reinkultur vorliegende Stämme der Schwefelpurpurbakterien sind in der Lage mit Sulfid und Kohlendioxid in einem rein anorganischen Nährmedium im Licht zu wachsen. Die Thiorhodaceae sind strikt anaerobe Organismen. Anaerobe Bedingungen werden durch Sulfid leicht erreicht. Das Sulfid dient aber vorwiegend als Wasserstoffdonator, außerdem wird der Sulfidschwefel in die schwefelhaltigen, organischen Verbindungen eingebaut. Bei einem Wachstum dieser Organismen mit Sulfid braucht der Nährlösung keine weitere Schwefelquelle zugesetzt zu werden. Als anorganische Wasserstoffdonatoren können andere reduzierte Schwefelverbindungen an die Stelle von Sulfid treten.

Die Verwertung von organischen Verbindungen als Wasserstoffdonatoren zum Wachstum der Thiorhodaceae unter anaeroben Bedingungen im Licht wurde schon von VAN NIEL (1932) beschrieben. Er stellte bei Chromatium ein Wachstum mit Hefeextrakt, Pepton, Natriumlactat und Natriumpyruvat fest.

MULLER (1933) prüfte weitere Substrate. Er setzte den Kulturen Glucose, Fructose, Propionat, Butyrat und Acetat zu.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden 22 verschiedene neu isolierte Stämme, außerdem zum Vergleich Chromatium Stamm D und ein Thiopedia-Stamm, geprüft. Die Anzahl der zu prüfenden Substrate wurde erheblich vermehrt.

Mit dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Substrate als Wasserstoffdonatoren genutzt werden können. Alle

Untersuchungen wurden in Gegenwart von Bicarbonat durchgeführt.
Folgende Substratgruppen wurden geprüft:

1) anorganische und organische Schwefelverbindungen
2) Alkohole
3) Zucker
4) Säuren des Tricarbonsäurezyklus
5) andere organische Säuren, einschließlich der Fettsäuren
6) anorganische und organische Stickstoffverbindungen

Die Untersuchungen zur Verwertung anorganischer und organischer Verbindungen als Wasserstoffdonatoren wurden wie folgt durchgeführt:
Es wurde die im methodischen Teil beschriebene Nährlösung verwendet. Sie enthielt o,o75% Natriumsulfid. Diese Konzentration ist ausreichend für die Herstellung anaerober Bedingungen und ermöglicht ein gerade erkennbares Wachstum. Den Nährlösungen wurden außerdem die zu prüfenden Substrate in einer Endkonzentration von o,1% (bzw. o,o5%) zugesetzt; der Wachstumserfolg wurde im Vergleich zum Hintergrundwachstum in den o,o75% Sulfid enthaltenden Kontrollflaschen (ohne zusätzlich verabreichte H-Donatoren) beurteilt. Sowohl die Kontrollkulturen, als auch die die Testsubstanzen enthaltenden, zu beurteilenden Kulturen (Testkulturen) wurden nicht mit Sulfid nachgefüttert. Die Verwertung der Testsubstanzen gab sich in einem gegenüber den Kontrollkulturen deutlich gesteigerten Wachstum zu erkennen. Bei Hemmung des Wachstums durch eine Testsubstanz erreichte die Testkultur erheblich geringere Zellzahlen als die Kontrollkultur, oder wuchs überhaupt nicht an.
Im Zusammenhang mit der Frage nach der Verwertung anorganischer und organischer Stickstoffverbindungen als

Wasserstoffdonatoren für das Wachstum sollte auch geprüft werden, ob Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle durch andere Stickstoffverbindungen, oder molekularen, im Nährmedium gelösten Stickstoff, ersetzt werden kann.

1) Anorganische und organische Schwefelverbindungen

Alle Thiorhodaceen-Stämme vermögen mit Sulfid als Wasserstoffdonator zu wachsen. Der Nährlösung für eine autotrophe Kultur wurde o,o75% Natriumsulfid zugesetzt. Diese Sulfidkonzentration gewährleistet anaerobe Bedingungen und ermöglicht als H-Donator gerade sichtbares Wachstum. Da Sulfid in höherer Konzentration auf die meisten untersuchten Stämme toxisch wirkt, mußte mit teilweise neutralisiertem Sulfid mehrfach nachgefüttert werden um höhere Zelldichten zu erreichen. Der bei Nachfütterung mit Sulfid erzielte Wachstumserfolg ist in Spalte 1 der Tab. 1 wiedergegeben. Die zu prüfenden Wasserstoffdonatoren wurden zusätzlich zu der anfänglichen, einmaligen Sulfidgabe von o,o75% verabreicht. Die Testkulturen, sowie die Kontrollkulturen wurden nicht nachgefüttert.
Wie aus der Tab. 1 weiter ersichtlich ist, können alle Schwefelpurpurbakterien mit elementarem Schwefel in Form von benetzter Schwefelblüte wachsen. Das Nährmedium wird durch die Oxidation des Schwefels zu Sulfat stark angesäuert und muß von Zeit zu Zeit mit Natronlauge oder Karbonat neutralisiert werden. Eine Förderung des Wachstums der geprüften Stämme mit Thiocyanat konnte nicht beobachtet werden. Thioglycolat, das jeweils frisch angesetzt und durch Filtration sterilisiert wurde, hemmt alle Kulturen, mit Ausnahme von Thiocystis Stamm 1313. Thiosulfat kann von einigen der geprüften Stämme unter den gegebenen Bedingungen nicht genutzt werden. In einigen

Fällen wurde eine pH-Abhängigkeit der Verwertung beobachtet. Die Ergebnisse der Verwertung von Thiosulfat sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 1
Wachstum mit Schwefelverbindungen als H-Donatoren

Organismen[1)]	Sulfid (nachgefüttert)	Schwefel	Thiocyanat (0,1%)	Thioglycolat (0,05%)
Chromatium Stamm 1611	++[2)]	+	-	HH
Chromatium Stamm 2811	++	++	-	HH
Thiocapsa Stamm 1711	++	++	-	HH
Thiocystis Stamm 1313	++	++	-	-
Chromatium wa. St. 1311	++	+	-	HH
Chromatium wei.St. 1812	++	++	-	HH
Chromatium o. St. 1811	++	++	H	HH

1) In dieser Tabelle und in den Tabellen der folgenden Seiten ist nur eine Auswahl der geprüften Stämme aufgeführt. Eine Tabelle mit allen geprüften Stämmen und Substraten befindet sich im Anhang.
2) Zeichenerklärung: siehe Methoden unter Abschnitt 13), Seite 12.

2) Zucker

Zucker sind die von der überwiegenden Mehrheit der Mikroorganismen verwertbare Kohlenstoff- und Energiequelle. Bereits MULLER (1933) gewann Anhaltspunkte, daß die Thiorhodaceae Glucose und Fructose zu verwerten vermögen.

Tabelle 2

Wachstum mit Thiosulfat als Wasserstoffdonator

Organismen	pH 6,9	pH 7,4
Chromatium spec. Stamm 1611	+	
Chromatium spec. Stamm 2811	–	+
Chromatium Stamm 6412	–	+
Chromatium Stamm 6411	+	+
Chromatium Stamm D	–	+
Thiopedia spec.	++	
Thiocapsa flor. Stamm 1711	++	
Thiocapsa flor. Stamm 6311	++	
Thiocapsa flor. Stamm 1813	+	
Thiocapsa flor. Stamm 6612	+	
Thiocystis spec. Stamm 2311	++	
Thiocystis spec. Stamm 6111	(+)	
Thiocystis spec. Stamm 1313	–	
Thiocystis spec. Stamm 2711	–	
Rhodothece consp. Stamm 6611	++	
Rhodothece pend. Stamm 1314	++	
Chromatium spec. Stamm 1211	++	
Chromatium spec. Stamm 1312	–	
Chromatium wa. Stamm 1311	–	
Chromatium wei. Stamm 6211	–	
Chromatium o. Stamm 1811	–	

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Verwertung von Zuckern und verwandten Verbindungen als Wasserstoffdonatoren dargestellt,
Ribose war ohne Einfluß auf das Wachstum der untersuchten Stämme.

Tabelle 3
Verwertung von Zuckern [1)]

Organismen	Mannit	Glucose	Fructose	Ribose	Gluconat	Ascorbat
Chr. St. 1611	-	-	++	-	-	+
Chr. St. 2811	-	-	-	-	-	-
Chr. St. 6411	-	-	-	-	-	-
Chr. St. D	-	-	-	-	-	-
Thiopedia	-	-	++	-	-	-
Thiocapsa St. 6311	-	-	++	-	-	-
Thiocapsa St. 1813	-	-	++	-	-	-
Thiocystis St.1313	-	+	-	-	(+)	-
Thiocystis St.2311	++	+	-	-	-	-
Thiocystis St.6111	-	++	-	-	(H)	-
Thiocystis St.2711	-	-	++	-	-	-
Rhodothece St.6611	-	-	+	-	-	-
Rhodothece St.1314	-	+	-	-	HH	-
Chr. St. 1211	-	+	-	-	-	-
Chr. wa. St. 1311	-	-	-	-	-	-
Chr. wa. St. 6512	-	-	-	-	-	-
Chrom.wei.St.6211	-	-	-	-	(H)	-
Chrom.wei.St.1812	-	-	-	-	-	-
Chrom.o. St. 1811	-	-	-	-	H	-

1) Die Substrate wurden in einer Endkonzentration von o,1% den Kulturflaschen zugesetzt. Die Stammlösungen wurden durch Filtration (Seitz-Filter, EKS) sterilisiert. Ascorbat wurde jeweils frisch angesetzt.

Mannit wurde von Thiocystis Stamm 2311 gut verwertet; die übrigen Stämme wurden weder gefördert, noch gehemmt. Mit Ascorbat wuchs nur Chromatium Stamm 1611.
Durch Gluconat wurde das Wachstum von Thiocystis Stamm 1313 leicht gefördert, von Thiocystis Stamm 6111, Chromatium weissei Stamm 6211 und von Chromatium okenii Stamm 1811 schwach gehemmt. Mit Gluconat wuchsen die Kulturen von Rhodothece pendens Stamm 1314 nicht an.
Zu den Stämmen, die mit Glucose wachsen, gehören Thiocystis, mit Ausnahme von Stamm 2711, der mit Fructose wächst, Rhodothece pendens Stamm 1314 und Chromatium Stamm 1211.
Alle Stämme von Thiocapsa, Thiocystis Stamm 2711, Rhodothece conspicua Stamm 6611 und Chromatium Stamm 1611 wuchsen relativ gut mit Fructose.

3) Alkohole

Chromatium Stamm D und Thiopedia spec. (HURLBERT und LASCELLES, 1963), sowie andere Chromatien- und Thiocystisstämme (MULLER, 1933) sind bereits auf die Verwertung von Alkoholen geprüft worden.
Äthanol wurde von keinem unserer 22 Stämme verwertet, wirkte aber auch nicht toxisch. Morphologisch unterschieden sich die in Gegenwart von Äthanol gewachsenen Zellen nicht von den Organismen in der Kontrollkultur. Bei Chromatium Stamm 6412 wurde eine leichte Verschiebung der Farbe von braun zu gelb-braun beobachtet. Thiocystis Stamm 2311 setzte sich in Flocken am Boden des Kulturgefäßes ab.
Methanol hemmt einige Stämme leicht, insbesondere Thiocapsa, Rhodothece, Chromatium warmingii und Chromatium okenii. Nach einer längeren Inkubation im Licht verklumpten einige Kulturen und setzten sich am Boden ab.

Tabelle 4
Verwertung von Alkoholen [1)]

Organismen	Methanol	Äthanol	Propanol	Glycerin
Chr. St. D	-	-	-	-
Thiopedia	-	-	-	++
Chr. St. 1611	-	-	-	-
Chr. St. 6412	-	-	-	-
Thiocapsa St. 1711	(H)	-	-	+
Thiocapsa St. 6311	(H)	-	-	++
Thiocystis St.2311	H	-	-	-
Thiocystis St.2711	-	-	+	-
Chr. wa. St. 1311	(H)	-	-	-
Chr. wei. St. 1812	-	-	-	-
Chr. o. St. 1811	(H)	-	-	-

1) Die Stammlösungen der Alkohole wurden durch Filtration (Seitz-Filter) sterilisiert. Die Endkonzentration in den Kulturlösungen betrug o,1%.

Mit Propanol wurde ein Wachstum nur bei Thiocystis Stamm 2711 festgestellt. Alle anderen geprüften Stämme konnten Propanol als Substrat zum Wachstum nicht nutzen. Glycerin erwies sich als gutes Substrat für alle Thiocapsa-Stämme und für Thiopedia. Alle anderen geprüften Stämme konnten Glycerin nicht verwerten.
Die Tab. 4 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

4) Fettsäuren

Die Fettsäuren, besonders die langkettigen, sind für Athiorhodaceae als Substrat gut geeignet, daher wurden diese Säuren auch bei Thiorhodaceae geprüft.
Die höheren Fettsäuren: Caproat, Caprylat und Pelargonat wurden nur bei Chromatium Stamm 1611 geprüft, da dieser Stamm die niederen Fettsäuren gut verwertet.
Caproat wird nicht verwertet, Caprylat hemmt das Wachstum, die Kulturen mit Pelargonat wuchsen überhaupt nicht an.
Die meisten Stämme sind durch die getesteten Fettsäuren in der gegebenen Konzentration im Wachstum gehemmt.

Tabelle 5
Wachstum mit Fettsäuren [1)]

Organismen	Butyrat	Crotonat	Propionat
Chromatium St. 1611	++	++	++
Chromatium St. 6412	-	-	HH
Chromatium St. D	-	H	+
Thiopedia spec.	-	H	++
Thiocapsa St. 1813	-	H	(H)
Thiocapsa St. 1711	(H)	HH	HH
Thiocapsa St. 6612	HH	HH	HH
Thiocystis St. 2711	+	++	++
Thiocystis St. 6111	-	H	H
Thiocystis St. 2311	H	HH	HH
Rhodothece St. 1314	H	HH	HH
Chr. wa. St. 1311	(H)	HH	HH
Chr. o. St. 1811	HH	HH	(H)

Mit Butyrat, Crotonat und Propionat wuchsen Chromatium Stamm 1611 und Thiocystis Stamm 2711 gut. Propionat wird außerdem von Chromatium Stamm D und Thiopedia spec. als Wachstumssubstrat genutzt.
Die Tab. 5 gibt eine Übersicht über die Verwertung der geprüften Säuren durch einige Stämme.

Tabelle 6
Wachstum mit organischen Säuren als H-Donatoren [2)]

Organismen	Malat	Succinat	Fumarat	Ketoglutarat	Citrat
Chromatium Stamm 1611	++	++	++	++	++
Chromatium St. 6411	++	++	++	+	-
Chromatium St. D	++	++	++	-	-
Thiopedia spec.	++	++	++	-	-
Thiocapsa St. 1711	++	+	+	-	-
Thiocapsa St. 6612	+	++	++	-	-
Thiocystis St. 2311	(+)	+	+	+	-
Thiocystis St. 2711	(+)	(+)	-	-	-
Thiocystis St. 1313	-	-	-	-	-
Rhodothece St. 6611	+	-	-	-	-
Chr. wa. St. 1311	-	-	-	-	-
Chr. wei. St. 6211	-	-	-	-	-
Chr. o. St. 1811	-	-	-	-	-

1) Die Fettsäuren wurden den Kulturflaschen in einer Konzentration von o,o5% zugesetzt.
2) Die Konzentration der organischen Säuren betrug o,1%

5) Organische Säuren

a) Säuren des Tricarbonsäurezyklus

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Funktion des Tricarbonsäurezyklus bei anaeroben Bakterien wurden fünf Säuren, die Intermediärprodukte dieses Zyklus sind, geprüft.
Citrat (siehe Tab. 6) ermöglichte Chromatium Stamm 1611 ein gutes Wachstum. Bei allen anderen geprüften Stämmen hatte Citrat keinen Einfluß.
Mit Ketoglutarat wuchsen von den 22 geprüften Stämmen nur fünf. Die anderen Stämme wurden im Wachstum weder gefördert, noch gehemmt.
Mit Malat, Succinat und Fumarat wuchsen die „großen" Chromatien nicht. Eine Hemmung des Wachstums durch diese Säuren konnte nicht festgestellt werden.

b) Andere organische Säuren

Acetat tritt als Stoffwechselendprodukt vieler Bakterien in der Natur auf. Pyruvat spielt im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Rolle. Die Verwertung dieser Substrate für das Wachstum der Thiorhodaceae ist daher von besonderem Interesse. Die russische Arbeitsgruppe untersuchte das Wachstum von Chromatium vinosum in Bicarbonat-freiem Nährmedium mit einem Gemisch zweier organischer Säuren, z.B. Formiat und Propionat. Athiorhodaceae können anaerob im Licht in einem Nährmedium wachsen, das Benzoat enthält. Die Verwertung dieser Säure sollte daher in unsere Untersuchungen einbezogen werden.
Pyruvat und Acetat erwiesen sich für alle geprüften Stämme als beinahe ausnahmslos bestgeeignetste Substrate, lediglich Rhodothece pendens Stamm 1314 wurde durch Acetat im Wachstum gehemmt.

Tartrat hatte keinen Einfluß auf das Wachstum.
Glycolat hemmte alle Kulturen.
Lactat und Formiat wurden nur von wenigen Stämmen genutzt. Während Chromatium Stamm 1611 und Thiopedia mit Lactat gut wuchsen, wurde Chromatium Stamm D durch diese Säure nur leicht gefördert. Formiat wurde nur von Chromatium Stamm 2811 und Chromatium Stamm D verwertet.
Benzoat hemmt das Wachstum der Thiorhodaceae. Die Hemmung ist in den verschiedenen morphologischen Gruppen unterschiedlich. Eine Förderung konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.
Einzelheiten über die Verwertung von organischen Säuren sind der vollständigen Tabelle im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.
Pyruvat wurde jeweils frisch angesetzt und durch Filtration sterilisiert. Die Endkonzentration in den Kulturen betrug o,1%.
Lactat, Benzoat, Glycolat und Formiat wurden den Kulturen in einer Konzentration von o,o5% zugesetzt.

6) Pepton, Caseinhydrolysat und Glutamat

An komplexen, stickstoffhaltigen Verbindungen wurden Pepton und Caseinaminosäuren (Caseinhydrolysat) geprüft. Als einzige reine Aminosäure wurde DL-Glutamat verwendet.
Glutamat wurde von keinem der untersuchten Stämme genutzt; Chromatium Stamm 1211 wurde durch Glutamat sogar leicht gehemmt. Gegenüber Pepton und Caseinaminosäuren verhielten sich die geprüften Stämme der verschiedenen morphologischen Gruppen unterschiedlich.
Eine deutliche Förderung des Wachstums mit Pepton wurde bei den„kleinen", braunen Chromatien, bei einem Thiocystisstamm und bei Chromatium warmingii Stamm 1311 beobachtet.Durch Pepton wurde Thiocystis Stamm 2311 und Rho-

dothece pendens Stamm 1314 jedoch vollständig gehemmt. Caseinaminosäuren förderten das Wachstum der geprüften Stämme der „kleinen", braunen Chromatien, eines Stammes von Thiocapsa, Thiocystis Stamm 2311 und Rhodothece conspicua Stamm 6611. Eine Hemmung des Wachstums durch dieses Eiweißhydrolysat wurde niemals beobachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tabelle 7
Wachstum mit Pepton, Caseinhydrolysat und Glutamat[1)]

Organismen	Pepton	Caseinamino-säuren	Glutamat
Chromatium Stamm 1611	+	(+)	–
Chromatium Stamm 6412	(+)	+	–
Chromatium Stamm 6411	(+)	+	–
Chromatium Stamm D	+	+	–
Thiopedia spec.	+	–	–
Thiocapsa Stamm 6311	–	–	–
Thiocapsa Stamm 6612	(+)	(+)	–
Thiocystis Stamm 2311	HH	+	–
Thiocystis Stamm 6111	+	–	–
Rhodothece Stamm 6611	(+)	+	–
Rhodothece Stamm 1314	HH	–	–
Chromatium wa. St. 1311	+	–	–

1) Die Konzentration der Substrate betrug o,1%

7) Verwertung verschiedener Stickstoffquellen

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine stickstofffreie Nährlösung benutzt. Es wurden Kulturen ohne jeden Zusatz, mit Zusatz von Harnstoff, Nitrat, oder Ammoniumchlorid (als Kontrolle) angesetzt. Kulturen, die angewachsen waren, wurden zusammen mit der Kontrollkultur mit teilweise neutralisiertem Sulfid nachgefüttert. War das Sulfid und der intrazellular gespeicherte Schwefel oxidiert, wurde die Fütterung mehrmals wiederholt, bis die Kulturen eine hohe Zelldichte erreicht hatten. Von diesen Kulturen wurden Subkulturen beimpft. Der Wachstumserfolg wurde im Vergleich zur Kontrollkultur mit NH_4Cl beurteilt. Ohne gebundenen Stickstoff in der Nährlösung wuchsen Thiopedia, Thiocapsa Stamm 6612, Chromatium warmingii Stamm 1113 und Chromatium weissei Stamm 6211 nicht. Eine Hemmung des Wachstums ohne gebundenen Stickstoff wurde bei Chromatium Stamm D, Thiocystis Stamm 2311,Chromatium Stamm 1211 und Chromatium okenii Stamm 1811 beobachtet. Die „kleinen", braunen Chromatien, Thiocapsa Stamm 1711, Thiocystis Stamm 1313 und Stamm 2711 wuchsen in einem Nährmedium ohne gebundenen Stickstoff gut. Aus diesen Befunden läßt sich auf eine Bindung von molekularem Stickstoff, der im Nährmedium gelöst ist, durch diese Organismen schließen.

Die Hemmung des Wachstums von Thiopedia, Chromatium Stamm D, Thiocapsa Stamm 6612, Thiocystis Stamm 2311, Chromatium warmingii Stamm 1113 und Chromatium weissei Stamm 6211 ließ sich durch Zusatz von Harnstoff zur Nährlösung aufheben. Thiopedia und Thiocystis Stamm 2311 können auch Nitrat als Stickstoffquelle verwerten.

Eine Hemmung des Wachstums durch Zusatz von Harnstoff zur Nährlösung wurde bei Chromatium Stamm 1611 beobachtet.

Durch Nitrat wurden Chromatium Stamm 1611 und Thiocystis

Stamm 1313 im Wachstum gehemmt.

Tabelle 8

Verwertung von NH_4Cl, Nitrat und Harnstoff als N-Quelle

Organismen	mit NH_4Cl	ohne NH_4Cl	Harnstoff	Nitrat
Chromatium Stamm 1611	++ [1)]	++	+	+
Chromatium Stamm 2811	++	++	++	++
Chromatium Stamm 6412	++	++	++	++
Chromatium Stamm D	++	+	++	+
Thiopedia spec.	++	-	++	++
Thiocapsa Stamm 1711	++	++	++	++
Thiocapsa Stamm 6612	++	-	++	+
Thiocystis Stamm 2311	++	+	++	++
Thiocystis Stamm 1313	++	++	++	+
Thiocystis Stamm 2711	++	++	++	++
Chromatium Stamm 1211	++	+	+	+
Chromatium wa. St. 1113	++	-	++	+
Chromatium wei. St. 6211	++	-	++	+
Chromatium o. St. 1811	++	+	+	+

1) Zeichenerklärung:

++ = gutes Wachstum

\+ = Wachstum geringer als in der Kontrolle mit NH_4Cl

\- = Kulturen nicht gewachsen

8) Prüfung auf Nitritanhäufung

Für diesen Test wurden aus den Nitratkulturen und den Kontrollkulturen ohne Nitrat in Abständen von mehreren Tagen je ein Tropfen Kulturlösung entnommen und auf einer Tüpfelplatte mit einem Reagenz nach Griess-Ilosvay auf Nitrit geprüft.
Der Nitritnachweis verlief positiv bei Chromatium Stamm 1611, Thiocystis Stamm 2311 und bei Chromatium Stamm 1211.

9) Hydrogenase und Katalase

Hydrogenase und Katalase konnten bei Chromatium Stamm D nachgewiesen werden. Beide Enzyme sind in den Chromatophoren lokalisiert. Hydrogenase wird auch mit der Bindung von molekularem Stickstoff in Zusammenhang gebracht. Hydrogenase und Katalase wurden in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit qualitativ nachgewiesen.
Die Reduktion von Methylenblau unter Wasserstoffatmosphäre diente zum Nachweis von Hydrogenaseaktivität, die Freisetzung von Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid von Katalaseaktivität.
Bei Chromatium weissei Stamm 6211 und 1812 und bei Chromatium okenii Stamm 1811 konnte unter diesen Versuchsbedingungen weder Hydrogenase noch Katalase nachgewiesen werden. Die übrigen geprüften Stämme zeigten Aktivität beider Enzyme.

1o) Vitamin B_{12}-Bedürfnis

Ein Vitamin B_{12}-Bedürfnis liegt bei Chromatium warmingii, Chromatium weissei, Chromatium okenii und Rhodothece pendens vor. Alle anderen Stämme sind nicht Vitamin B_{12}-bedürftig.

B. Die Thiorhodaceen-Gattungen und ihre Substrat-Spektren

Die Charakterisierung der Thiorhodaceae geht auf Beschreibungen von WINOGRADSKY (1888) zurück. Diese Beobachtungen und Beschreibungen wurden durch Untersuchungen an Reinkulturen durch BAVENDAMM (1924), VAN NIEL (1932) und MANTEN (1942) ergänzt.
Die Charakterisierung dieser Organismen beruht auf morphologischen Merkmalen, wie der Bildung von Aggregaten, Form und Größe der Einzelzellen und Farbe der Pigmente. Viele Gattungen lassen sich durch besonders auffällige Merkmale gut voneinander abgrenzen. Bei einigen Organismen, z.B. der Gattung Chromatium, ist die Identifizierung jedoch schwierig (SCHMIDT et al., 1965).
Es wurde erwartet, daß durch die physiologischen Untersuchungen an Reinkulturen verschiedener Stämme weitere unterscheidende Merkmale für die Bestimmung dieser Organismen gefunden würden.

1) Gattung: Thiocapsa

Hinsichtlich der Verwertung der geprüften Substrate verhielten sich die Stämme von Thiocapsa floridana sehr einheitlich.
Auffallend war das gute Wachstum mit Glycerin und Fructose, das auch bei Thiopedia beobachtet wurde. Neben Pyruvat und Acetat war auch Thiosulfat ein gutes Substrat (Tab. 9).
Malat, Succinat und Fumarat wurden wie von Thiopedia und den „kleinen", braunen Chromatien genutzt.
Pepton, Caseinaminosäuren und Harnstoff förderten das Wachstum von Thiocapsa floridana Stamm 6612 leicht.

Dieser Stamm war im Vergleich zu den anderen Stämmen gegen Fettsäuren, Nitrat und Mangel an gebundenem Stickstoff in Form von NH_4Cl empfindlich, während Benzoat das Wachstum nicht beeinflußte.

Tabelle 9
Thiocapsa floridana

Substrate	Stamm 1711	Stamm 6311	Stamm 1813	Stamm 6612
Thiosulfat	++	++	+	+
Schwefel	++	+	+	+
Thioglycolat	HH	HH	H	(H)
Glycerin	+	++	+	+
Fructose	+	++	++	+
Pepton	(+)	-	-	(+)
Caseinaminosr.	-	-	-	(+)
Pyruvat, Acetat	++	++	++	++
Thiocyanat,Äthanol	-	-	-	-
Propanol,Mannit	-	-	-	-
Glucose,Ribose	-	-	-	-
Gluconat,Ascorbat	-	-	-	-
Glutamat,Tartrat	-	-	-	-
Ketoglutarat,Citrat	-	-	-	-
Butyrat	(H)	-	-	HH
Crotonat	HH	HH	H	HH
Propionat	HH	H	(H)	HH
Harnstoff	-	-	-	(+)
Nitrat	-	-	(H)	H

2) Chromatium- und Thiocystisgruppe

Innerhalb dieser Gruppe der Schwefelpurpurbakterien ergaben sich große Unterschiede in der Verwertung organischer Substrate. In der Tab. 1o sind die Substratspektren von 3 Stämmen aufgeführt.
Gemeinsam war den geprüften Stämmen nur die Verwertung von Pyruvat und Acetat.

Tabelle 1o
Chromatium- und Thiocystisgruppe

Substrate	Chromatium St. 1611	Thiocystis St. 2711	Thiocystis St. 2311
Thiosulfat	+	-	++
Propanol	-	+	-
Mannit	-	-	++
Glucose	-	-	+
Fructose	++	++	-
Ascorbat	+	-	-
Pepton	+	-	HH
Caseinaminosr.	(+)	-	+
Butyrat	++	+	H
Crotonat	++	++	HH
Propionat	++	++	HH
Lactat	++	HH	HH
Malat	++	(+)	(+)
Succinat	++	(+)	+
Fumarat	++	-	+
Ketoglutarat	++	-	+
Citrat	++	-	-

Chromatium Stamm 1611 und Thiocystis Stamm 2711 zeichneten sich gegenüber den anderen Stämmen durch die Verwertung von Fettsäuren zum Wachstum aus. Sie wuchsen außerdem mit Fructose. Thiocystis Stamm 2311 wurde durch Fettsäuren im Wachstum gehemmt, verwertete aber Malat, Succinat und Fumarat, außerdem Glucose und Mannit. Ohne Einfluß auf das Wachstum waren:
Thiocyanat, Methanol, Äthanol, Glycerin, Ribose, Gluconat, Glutamat und Tartrat.
In der Tab. 11 sind weitere Stämme zusammengestellt. Chromatium Stamm 6412, 6411, 2811 und D wuchsen nicht mit Glucose, verwerteten aber Malat, Succinat und Fumarat gut, während Thiocystis Stamm 1313 und 6111 und Chromatium Stamm 1211 mit Glucose, nicht aber mit den Säuren des TCC wuchsen.
Chromatium Stamm 1312 verwertete nur Schwefel, Pyruvat und Acetat.

Tabelle 11
Chromatium- und Thiocystisgruppe

Substrate	Chromatium St. 6412	Chromatium St. 6411	Chromatium St. 2811	Chromatium St. D	Thiocystis St. 1313	Thiocystis St. 6111	Thiocystis St. 1211	Chromatium St. 1312
Thiosulfat	-	+	-	-	-	(+)	++	-
Glucose	-	-	-	-	+	++	+	-
Pepton	(+)	(+)	-	+	-	+	(+)	-
Caseinamin.	+	+	(+)	+	-	-	(H)	H
Malat	++	++	++	++	-	-	-	-
Succinat	++	++	++	++	-	-	-	-
Fumarat	++	++	++	++	-	-	-	-
Ketoglutar.	+	+	-	-	-	+	-	-

Auf Grund der Verwertung der gebotenen Substrate ließen sich drei Gruppen unterscheiden (Tab. 11).
Die erste Gruppe wuchs mit den Säuren des TCC gut.
Die zweite Gruppe wuchs mit Glucose, während der letzte Stamm keins dieser Substrate nutzen konnte.
Lactat in einer Endkonzentration von o,o5% förderte das Wachstum von Chromatium Stamm D. Formiat (o,o5%) förderte Chromatium Stamm 2811 und D. Ein Vitamin B_{12}-Bedürfnis konnte nicht nachgewiesen werden.

3) Gattung: Rhodothece

Tabelle 12
Rhodothece

Substrate	R.conspicua st. 6611	R.pendens st. 1314
Thiosulfat, Schwefel	++	++
Glucose	-	+
Fructose	+	-
Gluconat, Harnstoff	-	HH
Pepton	(+)	HH
Caseinaminosäuren	+	-
Pyruvat	++	++
Acetat	+	H
Malat	+	-

Die beiden untersuchten Stämme unterschieden sich hinsichtlich der Verwertung einzelner Substrate wesentlich.
Rhodothece conspicua wuchs mit Fructose, während Rho-

dothece pendens Glucose verwertete (Tab. 12).
Stamm 1314 war im Gegensatz zu Stamm 6611 durch Gluconat, Pepton, Acetat und Harnstoff gehemmt, Stamm 6611 wurde durch Pepton und Acetat im Wachstum gefördert. Dieser Stamm wuchs auch mit Malat und Caseinaminosäuren. In stickstofffreier Nährlösung wuchsen beide Stämme nicht. Rhodothece pendens war Vitamin B_{12}-bedürftig. Zur Nitratreduktion waren beide Stämme nicht befähigt. Succinat und Fumarat war bei beiden Stämmen ohne Einfluß auf das Wachstum.
Ohne Einfluß waren ferner:
Thiocyanat, Äthanol, Propanol, Glycerin, Mannit, Ribose, Ascorbat, Glutamat, Tartrat, Succinat, Fumarat, Ketoglutarat und Citrat.
Durch folgende Substrate waren beide Stämme gehemmt:
Thioglycolat, Methanol, Butyrat, Crotonat, Propionat, Lactat, Benzoat, Glycolat, Formiat und Nitrat.

4) Chromatium warmingii

Die „großen" Chromatien stellen stoffwechselphysiologisch eine recht einheitliche Gruppe dar.
Chromatium warmingii unterschied sich von Chr. weissei und Chr. okenii nur durch das Vorhandensein der Hydrogenase- und Katalaseaktivität.
Stamm 1311 wurde durch Pepton, Stamm 1113 durch Formiat etwas gefördert.(Tab. 13).

5) Chromatium weissei und Chromatium okenii

Bei diesen Stämmen ergab sich ein ähnliches Bild, wie bei Chromatium warmingii.
Propionat hemmte das Wachstum nur leicht, während bei zwei Stämmen mit Benzoat kein Wachstum beobachtet wurde. Formiat und Harnstoff hemmten nur schwach.

Hydrogenase- und Katalaseaktivität konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 13
Chromatium warmingii

Substrate	Stamm 1311	Stamm 1113	Stamm 6512
Schwefel	+	++	++
Pepton	+	-	-
Pyruvat	++	+	+
Acetat	++	++	++
Crotonat	HH	(H)	H
Formiat	HH	(+)	HH

Nicht verwertet wurden:
Thiosulfat, Thiocyanat, Äthanol, Propanol, Glycerin, Mannit, Glucose, Fructose, Ribose, Gluconat, Ascorbat, Caseinaminosäuren, Glutamat, Tartrat, Malat, Succinat, Fumarat, Ketoglutarat, Citrat, Harnstoff und Benzoat.
Es hemmten das Wachstum:
Thioglycolat, Methanol, Butyrat, Crotonat, Propionat, Lactat, Glycolat und Nitrat.

C. Assimilatorische Sulfatreduktion und Enzyme des Schwefelstoffwechsels

Die unter A. beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß sich Schwefelwasserstoff als Elekronendonator durch andere anorganische und organische Verbindungen ersetzen läßt. An Stelle von Sulfid können andere reduzierte Schwefelverbindungen von einigen Stämmen der Thiorhodaceae als Wasserstoffdonatoren genutzt werden. Auch organische Säuren, Zucker und Alkohole können verwertet werden.

Es sei nochmals hervorgehoben, daß alle Versuche in Gegenwart einer geringen Menge Sulfid zur Herstellung reduzierender Bedingungen durchgeführt worden sind; dieses Sulfid diente den Zellen gleichzeitig als Schwefelquelle. An die Untersuchungen zur Verwertung von Schwefelverbindungen und organischen Wasserstoffdonatoren sollten sich Versuche über die Verwertung von molekularem Wasserstoff als H-Donator anschließen. Für diese Versuche wurde die in Abb. 3 wiedergegebene Apparatur entwickelt. Da sich einerseits in Gegenwart von molekularem Wasserstoff ein genügend tiefes Redoxpotential einstellt, da andererseits aber der Nährlösung zugefügtes Sulfid durch den Gasstrom unkontrolliert ausgewaschen worden wäre, wurde auf den Zusatz von Sulfid (als Reduktionsmittel) ganz verzichtet. Unter diesen Bedingungen stand den Zellen also auch keine reduzierte Schwefelverbindung als Schwefelquelle zur Verfügung. Auf der Suche nach anderen Schwefelverbindungen, die lediglich als Schwefelquelle, nicht aber als Wasserstoffdonator fungieren, wurde festgestellt, daß einige Stämme zur assimilatorischen Sulfatreduktion befähigt sind. Dieser Befund war umso interessanter, als die Vorstellung verbreitet ist, daß

Schwefelpurpurbakterien Sulfat nicht reduzieren können (HENDLEY, 1955; HURLBERT und LASCELLES, 1963).

1) Wachstum mit molekularem Wasserstoff bei verschiedenen Schwefelquellen

Es wurden 250 ml-Jenaer-Glasflaschen (Versuchsanordnung und Nährlösung, siehe Methoden) sterilisiert, mit steriler Nährlösung gefüllt, beimpft und im Dauerlicht von 1.000 bis 2.000 Lux unter magnetischer Rührung und einer Gasatmosphäre von H_2 mit 10% CO_2 inkubiert. Als Schwefelquelle wurde der Nährlösung entweder Cystein oder Methionin in einer Endkonzentration von 0,003% zugesetzt. Eine Kultur blieb ohne Zusatz. Das Wachstum wurde gegen eine Dunkelkontrolle beurteilt.

Tabelle 14

Wachstum mit molekularem Wasserstoff als H-Donator

Zeit	Chromatium St. 6412			Chromatium St. D		
(Tage)	ohne Zusatz	mit Meth.	mit Cyst.	ohne Zusatz	mit Meth.	mit Cyst.
2	-	-	(+)	(+)	-	(+)
3	(+)	-	+	(+)	-	+
4	(+)	-	+	+	-	++
5	+	-	++	++	-	+++
6	+	-	+++	+++	-	+++
7	++	-	+++			
8	+++	-	+++			

Zeichenerklärung:

- \- = nicht gewachsen
- (+) = gerade sichtbares Wachstum
- \+ = Wachstum
- ++ = gutes Wachstum
- +++ = sehr gutes Wachstum

Aus der Tab. 14 ist ersichtlich, daß die Kulturen mit Zusatz von Methionin nicht wuchsen. In den Kontrollkulturen ohne Zusatz wuchsen beide Stämme wider Erwarten, wenn auch etwas langsamer, bis zu hoher Zelldichte. Alle Kulturen, wurden, wie im methodischen Teil beschrieben, auf Reinheit geprüft. Eine Kontamination konnte nicht festgestellt werden. Chromatium Stamm 1611 wurde unter den gleichen Bedingungen herangezogen. Nachdem die Kulturen mit Cystein und die Kulturen ohne Zusatz im Licht gut gewachsen waren, wurde aus allen Kulturen in frische Nährlösung überimpft. Nachdem auch diese Kulturen gewachsen waren, wurde wieder in frische Nährlösung überimpft. Die Zellen wurden so über drei Passagen weitergeführt. Sie wuchsen jeweils binnen drei Tagen zu hoher Zelldichte. Damit war erwiesen, daß Chromatium Stamm 6412, 1611 und D molekularen Wasserstoff als Wasserstoffdonator zu verwerten und über mehrere Subkulturen zu wachsen vermögen. Über die Verbreitung von Hydrogenase ist unter A. berichtet worden.

2) Wachstum mit Sulfat als einziger Schwefelquelle

Da die Nährlösung in den Kulturgefäßen ohne Zusatz für die Versuche zur Verwertung von molekularem Wasserstoff als Wasserstoffdonator außer Sulfat keine weitere Schwefelquelle enthielt, mußte angenommen werden, daß die geprüften Stämme zu einer assimilatorischen Reduktion von Sulfat befähigt sind. Um eine größere Zahl von Stämmen ohne die arbeitsaufwendige Versorgung mit H_2 auf die Befähigung zur assimilatorischen Sulfatreduktion prüfen zu können, wurden die üblichen Schraubverschlußflaschen als Kulturgefäße und Acetat als H-Donator verwendet. Alle bisher geprüften Stämme verwerten Acetat gut. Zur Herstellung reduzierender

Bedingungen wurde dem Medium Ascorbinsäure zugesetzt. Zur Versorgung mit Sulfat wurde $MgCl_2$ durch $MgSO_4$ ersetzt. In jedem Fall wurde der Wachstumserfolg mit einer Kontolle, die o,o3% Na_2Sx9H_2O als Schwefelquelle enthielt, verglichen. Alle in Reinkultur befindlichen Stämme wurden auf die Verwertung von Sulfat als einziger Schwefelquelle geprüft. Unter den genannten Bedingungen wuchsen alle „kleine", braunen Chromatien, Thiocapsa und Thiocystis Stamm 2711. Thiopedia war nicht in der Lage Sulfat assimilatorisch zu reduzieren.

3) Assimilation von ^{35}S-Sulfat mit molekularem Wasserstoff als H-Donator

Die bisherigen Befunde ließen bei einigen Stämmen der Schwefelpurpurbakterien auf eine assimilatorische Sulfatreduktion schließen. Um diese Ergebnisse zu sichern, wurde der Nährlösung ^{35}S-Sulfat zugesetzt und der Einbau des radioaktiven Schwefels in die Zellen verfolgt. Zur Durchführung dieser Versuche wurde auf die Versuchsanordnung (Abb. 3) zur Verwertung von molekularem Wasserstoff als H-Donator zurückgegriffen.
In einem Vorversuch wurde eine Kultur des in normalem sulfidhaltigen Nährmedium gewachsenen Chromatium Stamm 1611 geteilt. Die Zellen wurden in hochgefüllten, fest verschlossenen und sterilisierten Zentrifugenbechern aus Edelstahl anaerob bei 5.ooo U/min abzentrifugiert (Zentrifuge Modell Omikron der Firma Christ, Osterode/Harz), danach in sauerstofffreiem, sterilem Puffer gewaschen und in frischer Nährlösung suspendiert. Diese Suspension wurde in den schon beschriebenen Kulturgefäßen im Dauerlicht und im Dunkeln mit radioaktivem Sulfat ($3,2 \times 1o^4$ cpm/ml Kulturlösung) und unter H_2/CO_2-Atmosphäre unter magnetischer Rührung im thermo-

konstanten Wasserbad bei 30° inkubiert. In Zeitabständen von einigen Stunden wurden Proben von 1,5 ml entnommen, auf Membranfilter (siehe Methoden) abgesaugt, mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität der Zellen wurde mit einem Endfensterzählrohr gemessen.

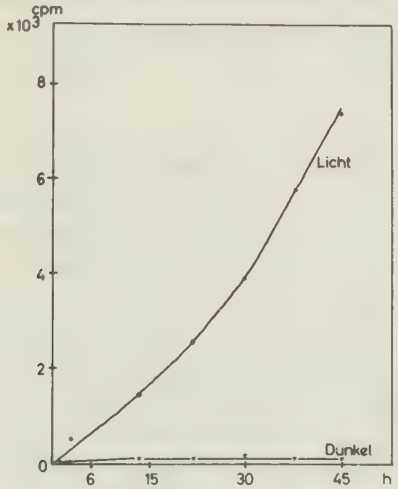

Abb. 4 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit molekularem Wasserstoff als H-Donator in Chromatium Stamm 1611

Sulfidgewachsene Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in frischer Nährlösung mit $Mg^{35}SO_4$ ($3,2 \times 10^4$ cpm/ml) suspendiert. Es wurden die in Abb. 3 dargestellten Kulturgefäße verwendet. In Zeitabständen von mehreren Stunden wurde 1,5 ml Kulturlösung auf Membranfilter abgesaugt und die Radioaktivität der Zellen gemessen.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Nach 45 Stunden war die Radioaktivität der Zellen aus 1,5 ml Kulturlösung der Lichtkultur auf ca. 8 x 10^3 cpm angestiegen. In die Zellen der Dunkelkultur fand kein nennenswerter Einbau von radioaktivem Schwefel statt. Um die Lichtabhängigkeit des Einbaus zu demonstrieren, wurde am Versuchsende die Dunkelkultur belichtet. Nach 45 Stunden war die Radioaktivität dieser Zellen auf den gleichen Wert wie im vorhergehenden Versuch angestiegen.

Bei den Wachstumsversuchen mit molekularem Wasserstoff und Sulfat wurde eine lange Adaptationszeit im Vergleich zu den Kulturen mit Cysteinzusatz festgestellt. In einem weiteren Versuch sollten solche Zellen auf den Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat verwendet werden, die bereits mit Sulfat als einziger Schwefelquelle gewachsen waren. Chromatium Stamm 6411 und zum Vergleich Chromatium Stamm D wurden aus einer Vorkultur mit Sulfat als einziger Schwefelquelle geerntet und mit $^{35}SO_4$ unter H_2/CO_2 inkubiert. Die Abb. 5 und 6 zeigen die Ergebnisse dieses Versuches. Die Radioaktivität der ganzen Zellen nahm bei Stamm 6411 in den ersten 2o Stunden linear zu und erreichte nach 32 Stunden einen Wert von ca. 3o x 10^3cpm/ 1,5 ml. Die Kultur enthielt etwa den gleichen Proteingehalt pro ml Kulturlösung wie bei Abb. 4. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Chromatium Stamm D.

Die bisherigen Einbauversuche und die daraus resultierende Radioaktivität der Zellen bestärkte uns in der Annahme, daß die genannten Stämme zu einer assimilatorischen Reduktion des Sulfats befähigt sind. Um weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, sollte versucht werden, ^{35}S in den schwefelhaltigen Verbindungen direkt nachzuweisen. Hierzu wurde Thiocapsa floridana Stamm 1711 unter den gleichen Bedingungen herangezogen wie

Chromatium Stamm 6411 und D. Die Kinetik der Aufnahme des radioaktiven Sulfats ist in Abb. 7 dargestellt.

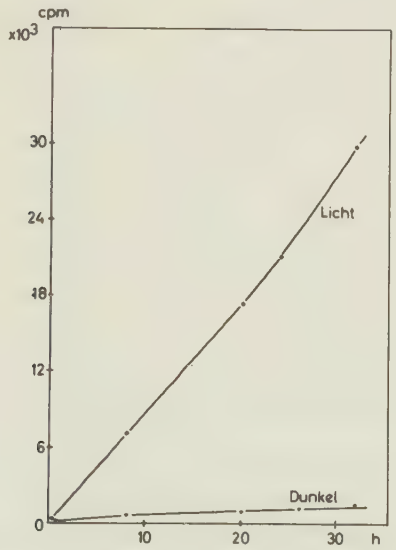

Abb. 5 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit molekularem Wasserstoff als H-Donator in Chromatium Stamm 6411

Es wurden mit Sulfat als einziger Schwefelquelle gewachsene Zellen abzentrifugiert, in Puffer gewaschen und in frischer Nährlösung mit ^{35}S-Sulfat suspendiert. Inkubation, Probenentnahme und Radioaktivitätsmessung erfolgte wie bei Abb. 4.

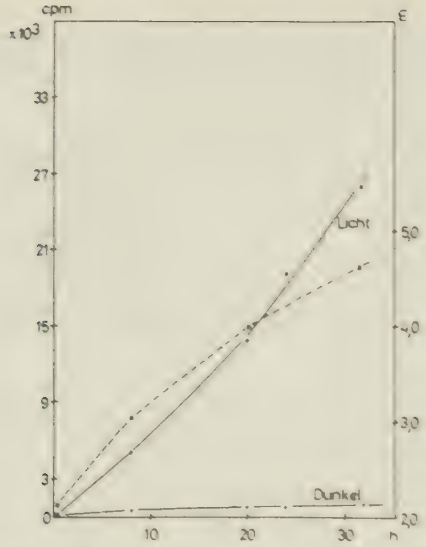

Abb. 6 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit molekularem Wasserstoff als H-Donator und Trübungsmessung als Maß für das Wachstum bei Chromatium Stamm D

Mit Sulfat als einziger Schwefelquelle gewachsene Zellen wurden wie bei Abb.4 geerntet, mit $^{35}SO_4$ inkubiert und die Radioaktivität der ganzen Zellen gemessen. Zur Trübungsmessung wurde der Kultur 1 ml Lösung entnommen, mit Wasser verdünnt und die Absorption bei 650 nm bestimmt.

o——o
v——v Radioaktivität der ganzen Zellen (linke Skala)

□----□ Zunahme der Trübung in der belichteten Kultur als Maß für das Wachstum (rechte Skala)

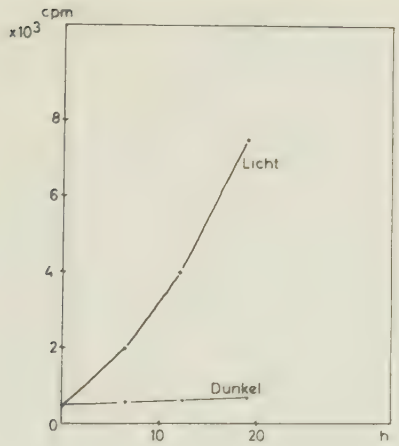

Abb. 7 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit molekularem Wasserstoff als H-Donator in Thiocapsa floridana Stamm 1711

Sulfidgewachsene Zellen wurden wie bei Abb. 4 geerntet, gewaschen und in frischer Nährlösung mit $^{35}SO_4$ suspendiert. Gemessen wurde die Radioaktivität der ganzen Zellen in Zeitabständen von mehreren Stunden an Proben aus der Licht- und Dunkelkultur.

4) Hydrolyse ^{35}S-markierter Zellen

Es sollte geprüft werden, ob die bisher gefundene radioaktive Markierung der Zellen möglicherweise auf einer bloßen Aufnahme und Anhäufung in intrazellularen Räumen, der Adsorption an die Zellwand von $^{35}SO_4$, oder auf einem Einbau lediglich in organische Ester beruht. Um den Verbleib des aufgenommenen radioaktiven Schwefels zu lokalisieren, wurde das Zellprotein hydrolysiert. Hierzu wurden die Zellen aus dem vorangegangenen Einbauversuch abzentrifugiert, gewaschen und mit einem Methanol-Aceton-Gemisch extrahiert, um Pigmente und schwefelhaltige Intermediärprodukte zu entfernen. Die so behandelten Zellen wurden mit HCl (siehe Methoden) hydrolysiert. Die papierchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte und anschließende Entwicklung der Chromatogramme mit Ninhydrin machte die Aminosäuren sichtbar. Die ^{35}S-markierten Aminosäuren konnten durch Belichtung von Röntgenfilm oder durch Auswertung der Chromatogrammstreifen mit einem Radiochromatographen erkannt werden. In den Abb. 8 und 9 sind die Ergebnisse dargestellt. Das Chromatogramm zeigt fünf radioaktive Flecken. Durch Cochromatographie konnten folgende Substanzen wahrscheinlich gemacht werden: Methionin, Methioninsulfoxid, Cysteinsäure, Cystin und Cysteinsulfen- und -Sulfinsäure.
Methionin und Methioninsulfoxid werden durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid und Molybdat als Katalysator zu Methioninsulfon, Cysteinverbindungen zu Cysteinsäure oxidiert.
Die Hydrolysate wurden nach der gegebenen Vorschrift (siehe Methoden) behandelt, durch Papierchromatographie getrennt und im Radiochromatographen ausgewertet. Die Ergebnisse waren nicht befriedigend, da eine Verschmierung der Flecken auf den Chromatogrammen

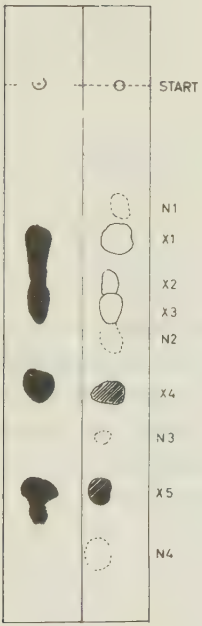

Abb. 8 Radioautogramm und Chromatogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 1711

^{35}S-markierte Zellen, wie bei Abb. 7, wurden abzentrifugiert, gewaschen und mit HCl hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im absteigenden System nach HIRSCH chromatographiert. Von den Chromatogrammen wurden Streifen von 4 cm Breite abgeschnitten. Ein Streifen wurde mit Röntgenfilm Agfa Sino M 1 bis 2 Wochen in engen Kontakt gebracht und anschließend entwickelt. Der andere Streifen wurde mit Ninhydrin besprüht und bei 60° entwickelt.
N1-N4: nicht identifizierte Aminosäuren; X1-X3: durch Ninhydrin schwach gefärbte S-haltige Aminosäuren;
X4 und X5: durch Ninhydrin stark gefärbte S-haltige Aminosäuren

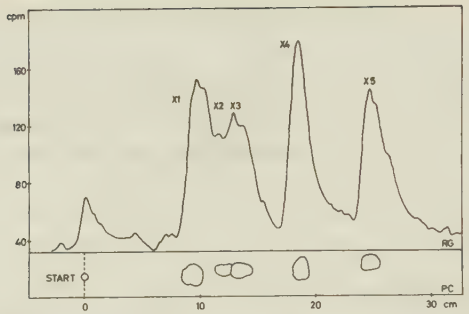

Abb. 9 Radiogramm und Papierchromatogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 1711

Das Papierchromatogramm(PC), wie bei Abb. 8, wurde mit einem Radiochromatographen ausgewertet (RG).

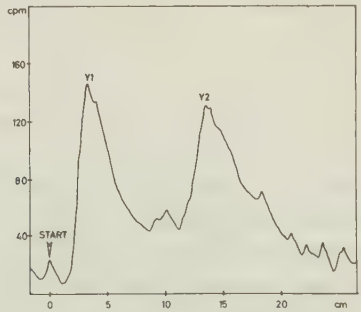

Abb. 1o Radiogramm des mit H_2O_2 behandelten Hydrolysates ^{35}S-markierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 1711

Das Hyrolysat wie bei Abb. 9 wurde mit Wasserstoffperoxid und Molybdat (als Katalysator) 4o min. bei Raumtemperatur behandelt und anschließend chromatographiert.

auftrat. Dies ist auf die verhältnismäßig hohe Konzentration an Molybdat zurückzuführen. Auf den Radiogrammen waren dennoch zwei deutlich getrennte Gipfel zu erkennen.

5) Assimilation von ^{35}S-Sulfat mit Acetat als Wasserstoffdonator

Bei allen bisherigen Versuchen wurde der Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat in die Zellen und die damit verbundene Markierung der schwefelhaltigen Aminosäuren mit molekularem Wasserstoff als H-Donator untersucht. Da der Umgang mit Wasserstoff Vorsichtsmaßnahmen erforderte, die eine Sterilhaltung der Kulturen erschwerten, wurde in weiteren Versuchen Wasserstoff durch Acetat ersetzt und Stickstoff als Gasphase benutzt. Die Nährlösung enthielt o,o35% NH_4-Acetat und o,o1% $Mg^{35}SO_4$ mit $1o^4$ cpm/ml. Die Kinetik des ^{35}S-Einbaus in Chromatium Stamm 1611 und D ist in den Abb. 11 und 12 dargestellt. Es wurde der Einbau von ^{35}S in Zellen, die mit Acetat gewachsen waren, verfolgt.
Die papierchromatographische Trennung der mit H_2O_2 oxidierten Hydrolyseprodukte hatte bisher keine guten Ergebnisse erbracht. Durch die hohe Konzentration an Molybdat im Hydrolysat trat eine Verschmierung der Flecken auf den Chromatogrammen auf. In den folgenden Versuchen wurde nicht das Hydrolysat mit dem Wasserstoffperoxid-Molybdat-Reagenz behandelt, sondern ein aliquoter Teil der ganzen Zellen nach Extraktion mit Methanol/Aceton. Nach der Behandlung mit dem Reagenz wurden die Zellen zur Entfernung des Molybdats gut gewaschen. Die papierchromatographische Trennung der durch salzsaure Hydrolyse erhaltenen Produkte führte im absteigenden System nach HIRSCH zu einer guten,

Trennung der Flecken (Abb. 13). Bei Chromatium Stamm L war die Oxidation mit H_2O_2 nicht vollständig. Die Radioaktivitätsverteilung auf den Streifenchromatogrammen der Hydrolyseprodukte von Chromatium Stamm D läßt vier scharf voneinander getrennte Gipfel erkennen. (Abb. 14). Das Radiogramm des Hydrolysates von Zellen, die mit H_2O_2 behandelt wurden, zeigt nur zwei Gipfel mit hoher Radioaktivität (Abb. 15). Bei der Auswertung der Streifenchromatogramme von Chromatium Stamm 1611 wurde eine stärkere radioaktive Markierung der Methioninverbindungen gefunden, als bei Chromatium Stamm D (Abb. 16 und 18). Dem Hydrolysat des in Abb. 16 und 18 dargestellten Versuches wurde zur Identifizierung der Flecken ^{35}S-Cystein und ^{35}S-Cysteinsäure zugesetzt. Aus den Abb. 17 und 19 kann man entnehmen, daß die Testsubstanzen die gleichen R_f-Werte haben, wie die im Chromatogramm auftretenden Flecken.

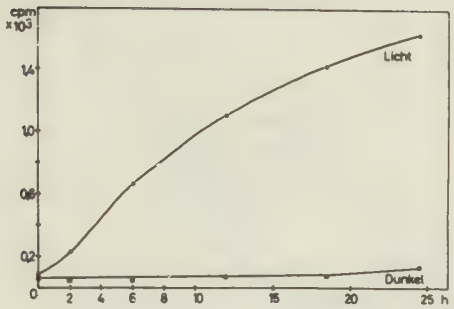

Abb. 11 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit Acetat als Wasserstoffdonator in Chromatium Stamm 1611

Die mit Acetat gewachsenen Zellen wurden wie bei Abb. 4 geerntet, mit radioaktivem Sulfat ($1{,}2x10^4$ cpm/1,5 ml Kulturlösung) inkubiert und die Radioaktivität der ganzen Zellen auf Membranfiltern gemessen.

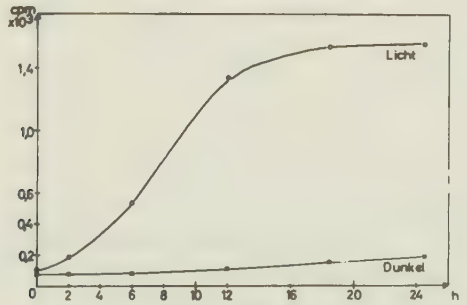

Abb. 12 Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat mit Acetat als Wasserstoffdonator in Chromatium Stamm D

Es wurden Zellen aus einer Acetat-Vorkultur benutzt. Versuchsdurchführung wie bei Abb. 11.

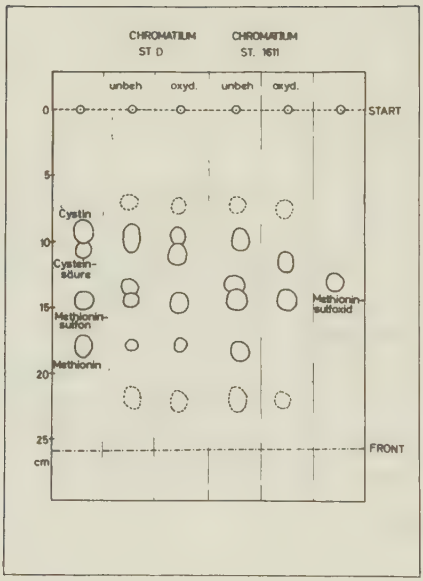

Abb. 13 Chromatogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter, Methanol-Aceton-vorextrahierter Zellen von Chromatium Stamm D und 1611 und S-haltiger Aminosäuren als Testsubstanzen

Es wurden Hydrolysate von unbehandelten und mit einem Wasserstoff-peroxid-Molybdatreagenz behandelten Zellen wie bei Abb. 8 chromatographiert.

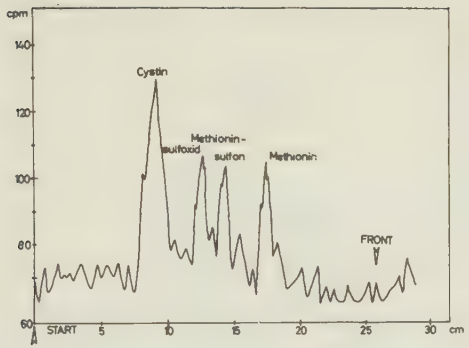

Abb. 14 Radiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter, Methanol-Aceton-vorbehandelter Zellen von Chromatium Stamm D

Es wurden Zellen wie bei Abb. 12 hydrolysiert, chromatographiert und mit dem Radiochromatographen ausgewertet.

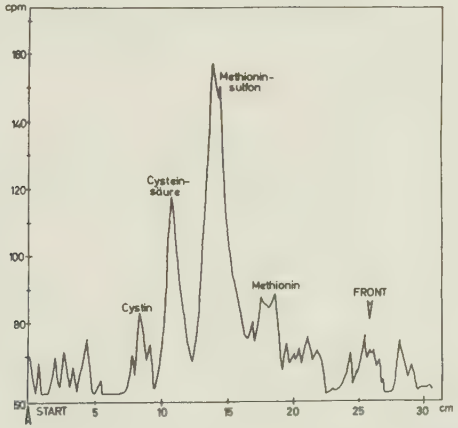

Abb. 15 Radiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter, Methanol-Aceton-vorbehandelter und mit H_2O_2 oxidierter Zellen von Chr. Stamm D

Es wurden Zellen wie bei Abb. 12 mit H_2O_2 behandelt, hydrolysiert und chromatographiert. Die Auswertung erfolgte wie bei Abb. 14.

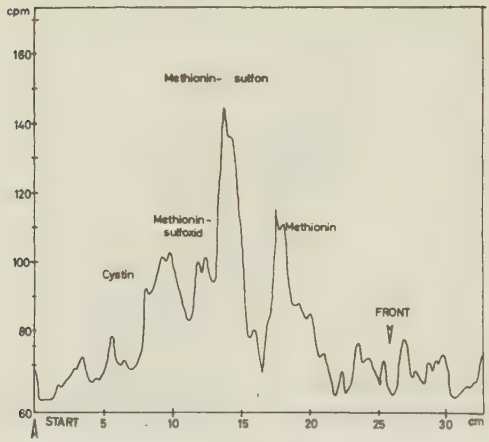

Abb. 16 Vergleichsradiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter Zellen von Chromatium Stamm 1611
Es wurden Zellen wie bei Abb. 11 hydrolysiert,und chromatographiert. Die Auswertung erfolgte wie bei Abb. 14.

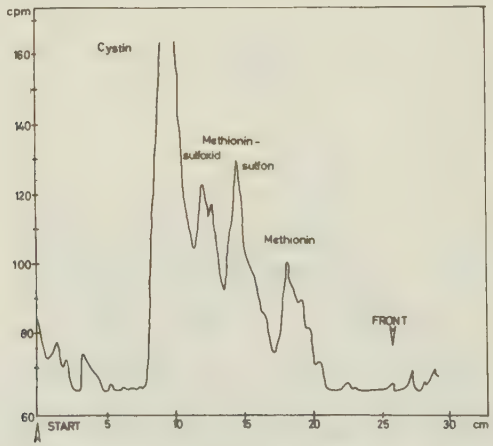

Abb. 17 Vergleichsradiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter Zellen mit Zusatz von ^{35}S-Cystein von Chromatium Stamm 1611

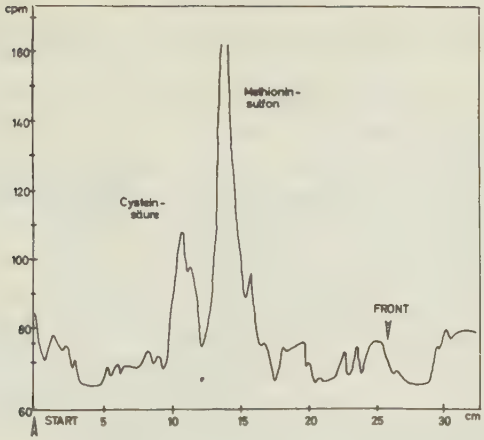

Abb. 18 Vergleichsradiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter, mit H_2O_2 behandelter Zellen von Chromatium Stamm 1611

Es wurden Zellen wie bei Abb. 16 oxidiert, hydrolysiert und chromatographiert.

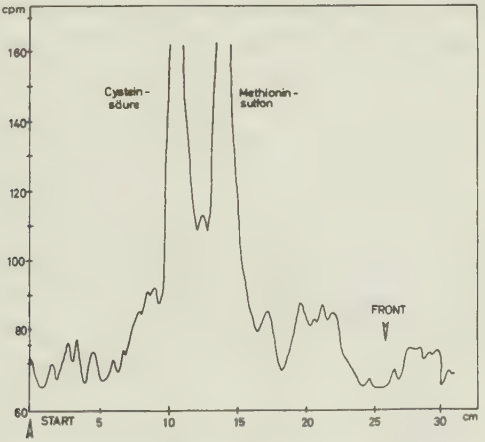

Abb. 19 Vergleichsradiogramm der Hydrolyseprodukte ^{35}S-markierter Zellen mit Zusatz von ^{35}S-Cystein-säure von Chromatium Stamm 1611

6) Nachweis von Adenosin-5-phosphosulfat-Reduktase

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß einige Stämme der Schwefelpurpurbakterien mit Sulfat als einziger Schwefelquelle zu wachsen vermögen. Die untersuchten Stämme sind also nicht auf reduzierte Schwefelverbindungen zum Wachstum angewiesen. Sulfat kann in Gegenwart eines Wasserstoffdonators reduziert werden, und der radioaktive Schwefel erscheint in den Methionin- und Cysteinverbindungen der Proteinhydrolysate. Im folgenden Teil dieser Arbeit wird über einige Versuche berichtet, die zur Klärung der Frage nach dem Biosyntheseweg der schwefelhaltigen Aminosäuren bei den bisher untersuchten Stämmen der Thiorhodaceae beitragen sollten.
Über die Aktivierung von Sulfat durch Hefe und andere Mikroorganismen und das daran beteiligte Enzym-System haben LIPMANN (1958), GREGORY und ROBBINS (1960) und WILSON (1962) in zusammenfassenden Arbeiten berichtet. Die Aktivierung von Sulfat benötigt ATP. Zwei schwefelhaltige Nucleotide, die mit der Aktivierung in Zusammenhang gebracht wurden, konnten isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Die Aktivierung scheint in zwei Schritten zu erfolgen. Der erste Schritt ist die Bildung von Adenosin-5-phosphosulfat (APS) aus ATP und Sulfat (Abb. 20). Pyrophosphat wird bei dieser Reaktion aus ATP freigesetzt. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde ATP-sulfat-adenylyl-transferase (früher: ATP-Sulfurylase, EC 2.7.74) genannt.

$$ATP + SO_4^{2-} \longleftrightarrow APS + PP_a$$

Im nächsten Schritt wird APS in 3-Stellung durch ATP phosphoryliert. Dabei entsteht 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat (PAPS). Das Enzym für diese Reaktion wurde ATP-adenylylsulfat-3-phosphotransferase (früher:

APS-Kinase, EC 2.7.1.25) genannt.

$$APS + ATP \longrightarrow PAPS + ADP$$

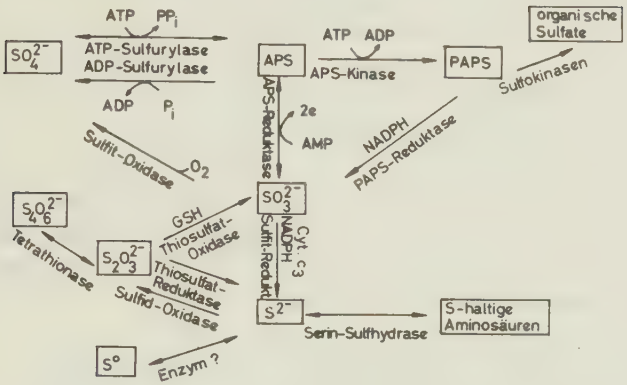

Abb. 2o Der Schwefelstoffwechsel (nach PECK, 1962)

In Hefe wurde von ROBBINS und LIPMANN (1958) ein Enzym gefunden, welches aus APS und anorganischem Phosphat ADP und Sulfat bildet.

$$APS + P_a \xrightarrow{\text{ADP-Sulfurylase}} ADP + SO_4^{2-}$$

Die dissimilatorischen Sulfatreduzierer Desulfovibrio desulfuricans, Clostridium nigrificans und Vibrio cholinicus, sowie die Thiobacilli enthalten ein Enzym (APS-Reduktase), welches APS als Substrat benötigt. APS wird zu AMP und SO_3^{2-} reduziert.

$$APS + 2e^- \longleftrightarrow AMP + SO_3^{2-}$$

Die Reaktion ist reversibel. Der Nachweis des Enzyms beruht auf der Bildung von APS aus AMP und SO_3^{2-}. Als Elektronenakzeptor wird $Fe(CN)_6^{3-}$ eingesetzt

(PECK et al., 1965). Es wird die Reduktion von Eisencyanid an der Absorption bei 420 nm gemessen.
PECK (1962) hatte bei Chromatium Stamm D im Vergleich zu Thiobacillus und Desulfovibrio nur eine sehr geringe Aktivität von APS-Reduktase nachweisen können. Dieser Befund ließ sich wiederholen. Es wurde bei Chromatium Stamm D eine spezifische Aktivität von 23 mE (-AMP= 18 mE, $-SO_3$= o mE) gefunden.
Da oft von Untersuchungen an Chromatium Stamm D auf die ganze Gruppe der Schwefelpurpurbakterien geschlossen worden ist, sollte die vorliegende Untersuchung hinsichtlich der Verbreitung der APS-Reduktase auf weitere Stämme ausgedehnt werden.
Es ergab sich ein überraschendes Bild.
Es wurden zunächst Stämme der „kleinen", braunen Chromatien untersucht. In Sulfid-Acetat-Nährlösung kultivierte Zellen wurden durch Zentrifugieren (5.000 U/min) geerntet, in Puffer gewaschen und in o,1M Tris-Puffer pH=8,o suspendiert. Von diesem Material wurde ein Rohextrakt durch Ultraschall (siehe Methoden) hergestellt und der klare Überstand nach Zentrifugation (1oo.ooo x g) als Extrakt mit einem Proteingehalt von o,8 bis o,9 mg/ml zum Test eingesetzt.
In Tab. 15 sind die spezifischen Aktivitäten von APS-Reduktase in Abhängigkeit von verschiedenen Reaktanten im Rohextrakt von Chromatium Stamm 1611 dargestellt.
Unter den gleichen Bedingungen wurden Rohextrakte von Chromatium Stamm 2811 und 6412 auf APS-Reduktase geprüft. Es wurden folgende spezifische Aktivitäten gefunden:

Chromatium Stamm 2811	spez. Aktivität	145 mE
	Proteingehalt	o,8 mg/ml
Chromatium Stamm 6412	spez. Aktivität	129 mE
	Proteingehalt	o,9 mg/ml

Tabelle 15

Bestimmung der spezifischen Aktivität von APS-Reduktase mit $Fe(CN)_6^{3-}$ und die Abhängigkeit von verschiedenen Reaktanten im Rohextrakt von Chromatium Stamm 1611

System	µmol $Fe(CN)_6^{3-}$ 1) reduz./Std.	spez. Aktivität (mE)
komplett	7,o	145
minus Extrakt	o	o
minus AMP	o,7	15
minus SO_3	o	o
Extrakt erhitzt	2,6	54

Die Messung erfolgte in einer 1-cm-Küvette im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 42o nm.
Die Küvette enthielt:
3oo µmol Tris-Puffer pH= 8,o; 4 µmol $K_3Fe(CN)_6$; 1o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 1o µmol AMP; o,8 mg Protein; Endvolumen 3,o ml.
1) spezifischer Absorptionskoeffizient:
$1{,}o3 \times 1o^3$ (1/mol x cm)
dE von 1,o = o,97 µmol/ml.

Die Tab. 15 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der durch den Rohextrakt katalysierten Reduktion von Eisencyanid von den Reaktionspartnern.
In einem weiteren Test wurden Extrakte verschieden kultivierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 6311 eingesetzt. Dieser Stamm wurde autotroph mit Sulfid und heterotroph mit Sulfat und Fructose kultiviert. Von beiden Kulturen wurden Extrakte durch Ultraschall hergestellt und zum Test eingesetzt.

Tabelle 16

Bestimmung der spezifischen Aktivität von APS-Reduktase und die Abhängigkeit von verschiedenen Reaktanten im Rohextrakt autotroph und heterotroph kultivierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 6311

System	spezifische Aktivität (mE) autotroph	heterotroph
komplett	229	123
minus Extrakt	o	o
minus AMP	15	-
minus SO_3	o	o
Extrakt gelagert[1)]	156	-

Durchführung wie bei Tab. 15
1) Extrakt bei - 18° drei Tage gelagert.

Die spezifische Aktivität von APS-Reduktase heterotroph kultivierter Zellen war wesentlich geringer als bei autotroph kultivierten Zellen (Tab. 16, Abb. 21). Durch dreitägige Lagerung des Extraktes bei - 18° trat ein Aktivitätsverlust von 36% ein.
Die Abb. 22 zeigt die lineare Beziehung zwischen der Aktivität von APS-Reduktase und der Proteinkonzentration in einem Rohextrakt von Thiocapsa floridana Stamm 6311.
Zum Vergleich der bisherigen Befunde wurde ein Extrakt von Chlorobium thiosulphatophilum Stamm 643o unter den gleichen Bedingungen wie bei Tab. 15 geprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt. Auch bei diesem Stamm wurde eine hohe spezifische Aktivität von APS-Reduktase gefunden.

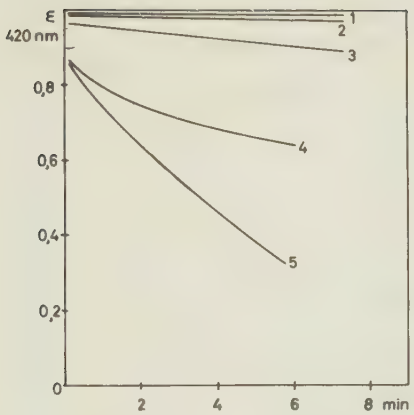

Abb. 21 Zeitlicher Verlauf der APS-Reduktase-Reaktion mit $Fe(CN)_6^{3-}$ in Abhängigkeit verschiedener Reaktanten mit Rohextrakten heterotroph und autotroph kultivierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 6311

Kompletter Ansatz:
3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 4 µmol $K_3Fe(CN)_6$; 1o µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 1o µmol AMP; Rohextrakt 2,o mg Protein; Endvolumen 3,o ml; $E_{42o\ nm}$.

1: minus $Fe(CN)_6^{3-}$
2: minus Extrakt, oder minus SO_3
3: minus AMP
4: Extrakt heterotroph mit Fructose und Sulfat kultivierter Zellen
5: autotrophe Zellen

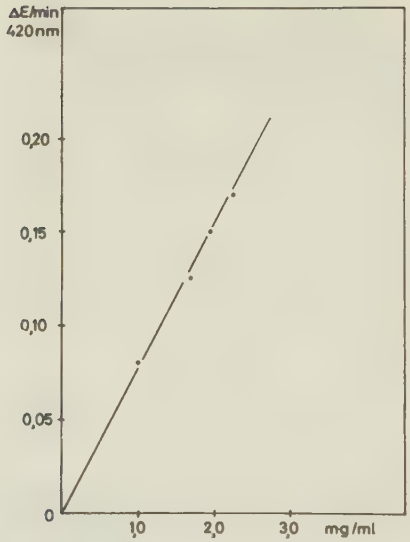

Abb. 22 Lineare Beziehung zwischen der durch den Rohextrakt katalysierten Reduktion von $K_3Fe(CN)_6$ und der Proteinmenge

Kompletter Ansatz wie bei Abb. 21.

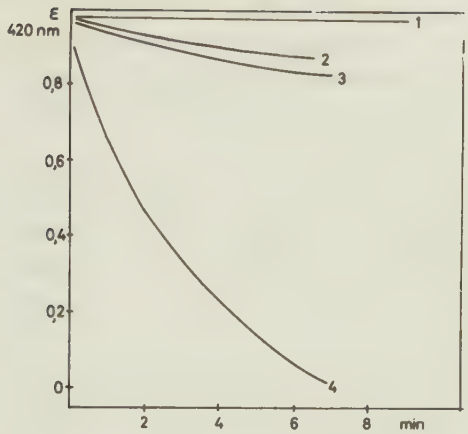

Abb. 23 Zeitlicher Verlauf der APS-Reduktase-Reaktion in Abhängigkeit verschiedener Reaktanten mit einem Extrakt aus Chlorobium thiosulphatophilum Stamm 643o

Kompletter Ansatz wie bei Abb. 21, Extrakt: 4,5 mg Protein.
1: minus Extrakt, oder minus SO_3
2: minus AMP
3: Extrakt 4 min. auf 1oo° erhitzt
4: kompletter Ansatz

Eine Übersicht über die ermittelten spezifischen Aktivitäten gibt die Tab. 17.

Tabelle 17
Zusammenstellung der spezifischen Aktivitäten von APS-Reduktase

Thiobacillus thioparus[1)]	490 mE
Desulfovibrio desulfuricans[1)]	290 mE
Thiocapsa floridana, autotroph	229 mE
Thiocapsa floridana, heterotroph	123 mE
Chromatium Stamm 2811	145 mE
Chromatium Stamm 1611	145 mE
Chromatium Stamm 6412	129 mE
Chlorobium thiosulphat. Stamm 6430	190 mE
Chlorobium phaeovib. Stamm 2531	107 mE
Chromatium Stamm D	23 mE

1) Werte nach Umrechnung der Daten von PECK (1965).

7) Versuche zum Nachweis von Sulfit-Oxidase

Sulfit-Oxidase in Extrakten aus Hundeleber katalysiert die Oxidation von Sulfit mit Sauerstoff oder anaerob mit Methylenblau (HEIMBERG et al., 1953; FRIDOVICH und HANDLER, 1956). Dieses Enzym wurde auch in Mikroorganismen gefunden. Die folgenden Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, ob bei den Schwefelpurpurbakterien eine solche Reaktion vorliegt.
Ein Extrakt autotroph kultivierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 6311 wurde in Warburggefäßen mit Sulfit unter Luft inkubiert. Eine Aufnahme von Sauerstoff ließ sich nicht zeigen. Auch anaerob mit Methylenblau konnte eine enzymatische Reduktion des Methylenblaus durch die Rohextrakte der geprüften Stämme nicht nachgewiesen werden (Tab. 18).

Tabelle 18

Bestimmung von Sulfit-Oxidase mit Rohextrakten verschiedener Stämme von Thiorhodaceae und Chlorobacteriaceae

Organismen	Warburgtest Aufnahme von O_2 (µl O_2)	Thunbergtest Redukt. von Mbl (dE)
Thiocapsa flor.		
Stamm 6311	o,o	o,oo2
Chromatium spec.		
Stamm D	-[1]	o,oo1
Chlorobium thiosul.		
Stamm 643o	-	o,oo2
Chlorobium phaeovib.		
Stamm 2531	-	o,oo3

Warburggefäß

Hauptraum: Tris-Puffer pH=8,o 25o µmol
Rohextrakt
Seitenarm: Na_2SO_3 in 5 mM EDTA 2o µmol
Gesamtvolumen: 2,o ml; Gasphase: Luft; Temperatur: 37°

Thunbergküvette

Hauptraum: Tris-Puffer pH=7,8 2oo µmol
Methylenblau o,1 µmol
Seitenarm: Na_2SO_3 in 5mM EDTA 2o µmol
Gesamtvolumen: 3,oml; Gasphase: Stickstoff (reinst)

1) nicht geprüft

8) Nachweis von ADP-Sulfurylase

In Extrakten von Thiobacillus thioparus wurde von PECK (1960) eine hohe spezifische Aktivität eines Enzyms gefunden, das auch in Hefe nachgewiesen worden ist. Dieses Enzym, ADP-Sulfurylase, katalysiert die Reaktion:

$$APS + P_a \longrightarrow ADP + SO_4^{2-}$$

Ein Extrakt autotroph kultivierter Zellen von Thiocapsa floridana Stamm 6311 wurde mit AMP, SO_3^{2-}, $Fe(CN)_6^{3-}$ und anorganischem Phosphat inkubiert. Die Bildung von ADP wurde gemessen. Aus der Abb. 24 kann man entnehmen, daß die Bildung von ADP aus AMP von der Gegenwart anorganischen Phosphats und Eisencyanid abhängig war. Der Extrakt war nicht dialysiert und enthielt eine geringe Menge anorganisches Phosphat. Nach Umrechnung der gefundenen Werte ergibt sich für die ADP-Sulfurylase eine spezifische Aktivität von 80 mE. ADP wird unter diesen Bedingungen aus AMP über APS als Intermediärprodukt gebildet:

$$AMP + SO_3^{2-} \xleftrightarrow{\text{APS-Reduktase}} APS + 2e^- \qquad (I)$$

$$APS + P_a \xrightarrow{\text{ADP-Sulfurylase}} ADP + SO_4^{2-} \qquad (II)$$

$$AMP + SO_3^{2-} + P_a \longrightarrow ADP + SO_4^{2-} + 2e^- \quad (I+II)$$

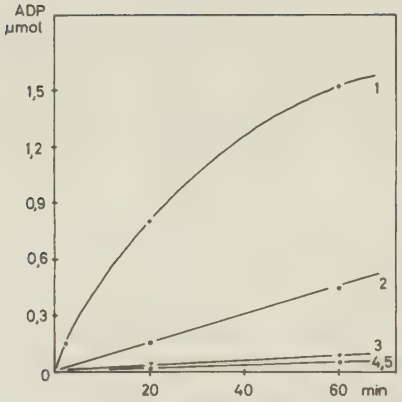

Abb. 24 Zeitlicher Verlauf der Bildung von ADP durch ADP-Sulfurylase aus einem Rohextrakt von Thiocapsa floridana Stamm 6311

Kompletter Ansatz:
300µmol Tris-Puffer pH=7,6; 30 µmol AMP; 30 µmol Na_2SO_3 in 5 mM EDTA; 12 µmol $K_3Fe(CN)_6$; 30 µmol PO_4; Rohextrakt 0,6 mg Protein; Endvolumen 3,0 ml.
Bestimmung des gebildeten ADP: siehe Methoden

9) Versuche zum Nachweis von ATP-Sulfurylase

Zwei Arbeitsgruppen untersuchten das sulfataktivierende System. ROBBINS und LIPMANN (1956) fanden ein Enzym, ATP-sulfat-adenylyl-transferase (früher: ATP-Sulfurylase), das aus ATP und Sulfat APS synthetisiert. Pyrophosphat wird bei dieser Reaktion aus ATP freigesetzt.

$$ATP + SO_4^{2-} \longleftrightarrow APS + PP_a$$

BANDURSKI et al. (1956) fanden, daß Sulfat durch andere Anionen der Gruppe VI ersetzt werden kann. Es entsteht dabei ein unstabiler Komplex zwischen AMP und Anion.

$$ATP + Anion \longrightarrow PP_a + (AMP\text{-}Anion) \quad (I)$$
$$(AMP\text{-}Anion) \longrightarrow AMP + Anion \quad (II)$$

$$ATP + Anion \longrightarrow AMP + PP_a + Anion \quad (I+II)$$

Zu diesen Anionen gehören: Selenat, Sulfit, Chromat, Wolframat und Molybdat. Der Nachweis der Reaktion beruht auf der Bildung von Pyrophosphat und der Bestimmung als anorganisches Phosphat nach Hydrolyse mit Pyrophosphatase.
Chromatium Stamm 2811 wurde autotroph mit Sulfid und heterotroph mit Pyruvat und Sulfat kultiviert. Rohextrakte aus beiden Kulturen wurden zum Test eingesetzt.
Die Bildung von Pyrophosphat in Abwesenheit von Molybdat wurde auf eine im Rohextrakt vorhandene Aktivität von Adenosintriphosphatase zurückgeführt. Aussagen über die Aktivität von ATP-Sulfurylase konnten aus

diesen Ergebnissen nicht gemacht werden (Tab. 19). Zum Vergleich wurde ein Rohextrakt aus Desulfovibrio desulfuricans mit verschiedenen Anionen der Gruppe VI auf ATP-Sulfurylase geprüft. Die Tab. 2o zeigt die Phosphatbildung aus Pyrophosphat, das durch die zugesetzten Anionen unter der katalytischen Wirkung von ATP-Sulfurylase aus ATP freigesetzt wurde. Mit Sulfat wurde aus dem zugesetzten ATP nur 1o% des möglichen, theoretischen Wertes von 6,7 µmol PO_4/ml freigesetzt. Demgegenüber erreichte die Freisetzung mit Molybdat den maximalen Wert. Adenosintriphosphatase konnte im Extrakt nicht nachgewiesen werden. Gereinigte Pyrophosphatase brauchte dem Extrakt nicht zugesetzt zu werden, da er eine genügend hohe Aktivität des Enzyms enthielt.

Tabelle 19

Bestimmung von Pyrophosphat, das aus ATP und Molybdat durch Extrakte aus Chromatium Stamm 2811 gebildet wird, nach Hydrolyse durch Pyrophosphatase als anorganisches Phosphat

System	PO_4 (µmol/ml) autotroph	heterotroph
komplett	3,3	3,2
minus Na_2MoO_4	-	4,6
minus ATP	-	o,4
minus Extrakt	-	o,3
Extrakt erhitzt	-	1,4

Der komplette Ansatz enthielt:

3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 4o µmol $MgCl_2$; 1o µmol ATP; 5 µmol Na_2MoO_4; Rohextrakt 6,o mg Protein; 5o µg Pyrophosphatase; Endvolumen 3,o ml; Temperatur: 3o°

Tabelle 2o

Bestimmung von Pyrophosphat, das aus ATP und verschiedenen Anionen der Gruppe VI durch einen Extrakt aus Desulfovibrio desulfuricans gebildet wird, nach Hydrolyse durch Pyrophosphatase als anorganisches Phosphat

System	Bildung von PO_4 (µmol/ml)		(%)
kompl. mit NaCl	o,4o	o,1o[1)]	2
" " Na_2SO_4	1,oo	o,7o	1o
" " Na_2SeO_4	1,35	1,o5	16
" " Na_2SeO_3	1,4o	1,1o	2o
" " Na_2CrO_4	3,4o	3,1o	46
" " Na_2WO_4	5,2o	4,9o	72
" " Na_2MoO_4	7,oo	6,7o	1oo
minus Extrakt	o,2o		
minus ATP	o,1o		

Der komplette Ansatz enthielt:

3oo µmol Tris-Puffer pH=8,o; 4o µmol $MgCl_2$; 1o µmol ATP; 5 µmol Anionen; Rohextrakt 1 mg Protein; Endvolumen 3,o ml; Temperatur: 3o°

1) Werte nach Abzug des Phosphatgehaltes des Extraktes und des ATP.

IV. Diskussion

A. Wachstum mit verschiedenen anorganischen und organischen Verbindungen als H-Donatoren

Schon früh haben die Schwefelpurpurbakterien das Interesse der Biologen geweckt. ENGELMANN äußerte 1883 die Idee, daß diese Bakterien zu den photosynthetischen Organismen gehören. WINOGRADSKY (1887) stellte die Thiorhodaceae dann zu den chemosynthetischen Bakterien. VAN NIEL (1932) entwickelte aus den beschriebenen Experimenten und seinen eigenen Beobachtungen an diesen Organismen die Theorie der bakteriellen Photosynthese. Er zeigte, daß Reinkulturen dieser Bakterien in einem rein anorganischen Medium mit CO_2 und Sulfid, oder anderen reduzierten Schwefelverbindungen, wie Thiosulfat, anaerob im Licht zu wachsen vermögen.

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{Licht}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$$

$$3\,CO_2 + 2\,S + 5\,H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 3\,(CH_2O) + 2\,H_2SO_4$$

Gesamtreaktion:

$$2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 2\,(CH_2O) + H_2SO_4$$

Auch organische Substanzen, wie Hefeextrakt, Pepton, Lactat und Pyruvat werden von Thiorhodaceae anaerob im Licht als Wasserstoffdonatoren an Stelle von Sulfid zum Wachstum genutzt. Diese Bakterien sind aber nicht fähig, wie die Athiorhodaceae, mit organischen Verbindungen und Sauerstoff im Dunkeln zu wachsen. Hierzu schreibt VAN NIEL (1932):

„Die Kultur der Schwefelpurpurbakterien im Dunkeln wurde durch Inoculation eines organischen Mediums, so-

wohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen, mit verschiedenen Stämmen und Inkubation der Kulturen in einem Brutschrank bei 25° versucht. Um die mögliche Existenz einer reinen Chemosynthese prüfen zu können, wurden auch Kulturen mit Sulfid, elementarem Schwefel und Thiosulfat geprüft. Die organischen Nährmedien enthielten Zucker (Glucose oder Fructose), Lactat, Hefeextrakt, oder Mischungen dieser Verbindungen. Diese Kulturen zeigten weder unter aeroben, noch unter anaeroben Bedingungen eine Entwicklung".
Eingehendere Untersuchungen über die Verwertung einfacher organischer Verbindungen durch Thiorhodaceae wurden von MULLER (1933) durchgeführt. Neben stickstofffreien, organischen Säuren und Zuckern wurde Äthanol und Glycerin geprüft. Es wurde aber kein Wachstum mit diesen Substraten beobachtet.
Die Verwertung von Alkoholen anaerob im Licht in Gegenwart von CO_2 konnte mit Kulturen von Athiorhodaceae gezeigt werden. Reinkulturen dieser Organismen wurden aus Anreicherungskulturen mit Äthanol gewonnen (FOSTER, 1942, 1944). Isopropanol wird von Rhodopseudomonas gelatinosa mit CO_2 im Licht vollständig zu Aceton dehydriert. Eine Oxidation von Äthanol konnte auch durch Chloropseudomonas ethylicum (Chlorobacteriaceae) nachgewiesen werden (KONDRATJEVA und PETROVA, 1963).
Chromatium Stamm D und Thiopedia wachsen nicht mit Äthanol, während sich Thiopedia mit Glycerin in Gegenwart und Abwesenheit von Bicarbonat gut entwickelt (HURLBERT und LASCELLES, 1963).
Die in Tab. 4 zusammengestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß Glycerin von Thiopedia und allen Stämmen von Thiocapsa gut verwertet wird. Methanol und Äthanol wurden von keinem Stamm als Wachstumssubstrat genutzt. Ein Thiocystisstamm wuchs gut mit Propanol.

Zucker wurden durch Thiorhodaceen-Stämme vom Thiocystis- und Pseudomonas-Typ zum Wachstum verwertet (MULLER, 1933). Die von Muller verwendete Nährlösung hatte einen pH-Wert von 8,5 bis 8,7. Es wird die Vermutung geäußert, daß dieses alkalische Medium die Verwertung begünstigt. Auch von facultativ anaeroben Chromatien werden Glucose und Glycerin in Gegenwart von Bicarbonat verwertet (KONDRATJEVA, 1956). Ein Wachstum mit Zuckern wurde auch bei Chromatium vinosum gefunden (OSNITSKAYA, 1958). Thiopedia nutzt Fructose, mit und ohne Bicarbonat, als Wasserstoffdonator. Mit Glucose, Gluconat und Mannit können weder Chromatium Stamm D, noch Thiopedia wachsen (HURLBERT und LASCELLES, 1963). KONDRATJEVA (1965) schreibt in ihrer Monographie:„Das Wachstum der Schwefelpurpurbakterien in zuckerhaltiger Nährlösung ist oft nur schwach und kann von einer Bildung organischer Säuren im Medium begleitet werden".
Organische Säuren werden von verschiedenen Stämmen der Thiorhodaceae im Licht verwertet. Die Umsetzung wird von einer Aufnahme, oder Abgabe von CO_2 begleitet; die Bilanz ist von der Oxidationsstufe der Säure abhängig (MULLER, 1933; VAN NIEL, 1944). Muller schreibt in dem Kapitel über die Verwertung von Butyrat: „Mit diesem Substrat wurde ein sehr beachtenswertes Phänomen beobachtet: CO_2 wurde aus dem Medium aufgenommen, anstatt gebildet".
Er untersuchte ferner das Kulturmedium und stellte fest, daß nur sehr geringe Mengen flüchtiger Säuren ausgeschieden wurden. Er schließt daraus, daß eine Gärung, wie sie bei anderen anaeroben Organismen zu beobachten ist, nicht stattfindet. Die gebotenen Substrate werden fast vollständig in Zellmaterial umgewandelt. Die hierzu nötige Energie entstammt der Photophosphorylierung. In Untersuchungen mit Rhodopseudomonas und Chromatium wurde Bicarbonat vollständig aus der Nähr-

lösung entfernt, außerdem wurden sehr geringe Impfmengen benutzt. Wurde den Kulturen nur eine einzige organische Säure zugesetzt, konnte kein Wachstum beobachtet werden. Erst die zusätzliche Verabreichung einer geringen Menge Bicarbonat oder Acetat zum Nährmedium ermöglichte ein gutes Wachstum (KONDRATJEVA, 1956; NEFELOVA, 1959).

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurde durchweg eine bicarbonathaltige Grundnährlösung verwendet. Die Substrate wurden in der Regel mit einer Konzentration von o,1% eingesetzt. Diese Konzentration ist für ein gut sichtbares Wachstum völlig ausreichend. Es wurde darauf verzichtet, höhere Konzentrationen zu prüfen, da bei einer Steigerung der Konzentration möglicherweise Nährlösungskomponenten ins Minimum geraten. Bei einigen Substraten trat schon bei dieser Konzentration eine Hemmung ein. Einige Säuren, insbesondere die langkettigen Fettsäuren, hemmen das Wachstum in höherer Konzentration. In diesen Fällen wurde die Substratkonzentration auf o,o5% erniedrigt. Propionat, Lactat und Formiat wurden bei einigen Stämmen in der noch geringeren Konzentration von o,o25% geprüft. Bei derartigen Versuchen stellte es sich heraus, daß das Wachstum mehrerer Stämme bei o,o25% noch deutlich gefördert wurde, während o,o5% bereits schwach oder vollständig hemmten. Es wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, das Problem der Abhängigkeit des Wachstums von der Substratkonzentration zu untersuchen, da diese Versuche nur einen Überblick über das Substratspektrum der einzelnen Stämme geben sollten.

Ammoniumsalze können von allen Thiorhodaceae als Stickstoffquelle genutzt werden. Die von PFENNIG (1961) entwickelte Nährlösung, die für diese Versuche benutzt wurde, enthält o,o3% Ammoniumchlorid oder eine ent-

sprechende Menge anderer Ammoniumsalze. Die Ammoniumsalze können durch Pepton oder Hefeextrakt ersetzt werden (VAN NIEL, 1944). Gleichzeitig dienen diese komplexen, organischen Verbindungen aber auch als Wasserstoffdonatoren. In den Versuchen zu dieser Arbeit wurden Pepton und Caseinaminosäuren in Gegenwart von Ammoniumchlorid, d.h. als Wasserstoffdonatoren, geprüft. Die Fähigkeit zur Nutzung dieser Verbindungen zum Wachstum ist nicht bei allen Stämmen vorhanden und ist auch innerhalb der morphologischen Gruppen unterschiedlich.
Nach KONDRATJEVA (1965) können viele Thiorhodaceae mit Harnstoff als einziger Stickstoffquelle wachsen.
Die unter A. beschriebenen Versuche haben dies nicht für alle Stämme bestätigen können. Besonders die größeren Formen der Thiorhodaceae, wie Chromatium weissei, Chromatium okenii, Chromatium Stamm 1211 und Rhodothece pendens, sind ohne Ammoniumsalze in der Nährlösung im Wachstum gehemmt.
Über die Fähigkeit von Chromatium minutissimum, Nitrat zu reduzieren, berichtet NAKAMURA (1939).
Von unseren Stämmen waren nur wenige in der Lage Nitrat zu reduzieren. Das bei der Nitratreduktion gebildete Nitrit wirkt toxisch (PETROVA, 1959).
Auch unsere Organismen sind durch das gebildete Nitrit im Wachstum gehemmt. Nitrat kann von Thiopedia und von einem Thiocystis-Stamm als Stickstoffquelle genutzt werden.
Die Kenntnis der Stickstoffixierung durch Purpurbakterien geht auf die Beobachtung zurück, daß die Bildung von molekularem Wasserstoff durch wachsende Kulturen von Rhodospirillum rubrum im Licht in einer Stickstoffatmosphäre gehemmt ist (GEST und KAMEN, 1949). Aus diesen Befunden schlossen die Autoren auf eine

Fixierung von molekularem Stickstoff. Versuche mit $^{15}N_2$ bestätigten diese Annahme. Die Stickstoffixierung in Gegenwart von Thiosulfat und Oxalacetat wurde mit ganzen Zellen von Chromatium untersucht (ARNON et al., 1961). Die Stickstoffbindung ist an das Wachstum unter anaeroben Bedingungen im Licht gebunden. Auch die zum aeroben Wachstum im Dunkeln befähigten Athiorhodaceae binden molekularen Stickstoff nur unter anaeroben Bedingungen im Licht. Die Aufnahme von $^{15}N_2$ im Dunkeln ist sehr gering. Die Stickstoffbindung durch Rhodospirillum rubrum wird durch 4% Sauerstoff in der Gasphase vollständig gehemmt. Ferner wurde beobachtet, daß die Stickstoffixierung nur bei höheren N_2-Partialdrucken mit maximaler Rate verläuft. Untersuchungen werden in den meisten Fällen mit einem Gasgemisch von 95% N_2 und 5% CO_2 durchgeführt.

Bei den hier beschriebenen Versuchen stand den Zellen N_2 in Form einer Luftblase in den Kulturflaschen zur Verfügung. In der Luftblase enthaltener Sauerstoff wurde durch das in der Nährlösung vorhandene Sulfid entfernt. Unter diesen Bedingungen waren nicht alle Stämme befähigt, molekularen Stickstoff zu binden. Die größeren Formen der Chromatien, außerdem Rhodothece pendens und Rhodothece conspicua wuchsen in den Kulturen ohne gebundenen Stickstoff nicht.

Hinsichtlich des Vitamin B_{12}-Bedürfnisses stellte sich heraus, daß Chromatium warmingii, Chr. weissei, Chr. okenii, Thiospirillum jenense und Rhodothece pendens dieses Vitamin zum Wachstum benötigen. Erst der Zusatz von Vitamin B_{12} zur Nährlösung ermöglichte die Kultivierung dieser Organismen (PFENNIG, 1961).

Hydrogenaseaktivität konnte bei Chromatium weissei und Chr. okenii nicht nachgewiesen werden. Versuche zum Nachweis dieses Enzyms bei Chromatium okenii Stamm 1111 (früher: Stamm Ostrau) durch TRÜPER (1964) verliefen

auch negativ. Die Hydrogenaseaktivität war bei allen untersuchten Stämmen von einer Katalaseaktivität begleitet.

Thioglycolat kann von einigen Thiorhodaceen-Stämmen im Licht zum Wachstum genutzt werden. Die CO_2-Fixierung im Licht in Gegenwart von intrazellularem Schwefel wird durch Thioglycolat gehemmt, während die Fixierungsrate bei schwefelfreien, mit Thioglycolat gewachsenen Zellen mit steigender Konzentration von Thioglycolat (bis o,o4M) anstieg. Auch im Dunkeln wird in Gegenwart von intrazellularem Schwefel oder Thiosulfat Kohlendioxid, wenn Thioglycolat zugegen ist, fixiert. Ein Wachstum mit Thioglycolat aerob im Dunkeln war nicht zu beobachten (TAYLOR, 1958).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Thioglycolat von unseren Stämmen als Wasserstoffdonator nicht genutzt werden kann und in den meisten Fällen sogar hemmend wirkte.

Wachstumsversuche mit Thiocyanat bei Chromatium Stamm D und Thiopedia verliefen negativ (HURLBERT und LASCELLES, 1963).

Durch Thiocyanat wurde das Wachstum unserer Stämme nicht beeinflußt.

Elementarer Schwefel in Form von benetzter Schwefelblüte kann von allen geprüften Stämmen zum Wachstum im Licht genutzt werden.

In Analogie zur Sulfidoxidation formulierte VAN NIEL (1932, 1936) die Thiosulfatoxidation in Chromatium Stamm D folgendermaßen:

$$2Na_2S_2O_3 + 4CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 2H_2SO_4 + 2Na_2SO_4 + 4(CH_2O)$$

Die Speicherung und Oxidation von Thiosulfatschwefel wurde bei Thiocapsa floridana und zwei Stämmen von Chromatium untersucht. Werden Zellen von Thiocapsa

floridana Stamm 1711 mit sulphanmarkiertem Thiosulfat bei pH 6,75 im Licht inkubiert, so wird rund 75% der Gesamtaktivität in den Zellen als Intrazellularschwefel nach etwa 1oo Minuten gefunden. Mit sulphonmarkiertem Thiosulfat wird keine Radioaktivität in den Zellen gefunden. Der radioaktive Schwefel erscheint als Sulfat im Medium.

Experimente mit Chromatium Stamm 1211, bei dem die Thiosulfatoxidation induziert werden kann, ergaben mit sulphanmarkiertem Thiosulfat bei pH 6,7 eine Radioaktivität von rund 1o% der Gesamtaktivität innerhalb der Zellen, bei pH 6,2 eine Speicherung von 25,7% der Radioaktivität als Intrazellularschwefel (TRÜPER und PFENNIG, 1966).

Bei Chromatium Stamm D wurde eine Anhäufung von Tetrathionat im Medium festgestellt, wenn das pH des Mediums von 7,3 auf 6,3 herabgesetzt wurde. Tetrathionat kann unter diesen Bedingungen nicht weiter zu Sulfat oxidiert werden (SMITH, 1966).

Aus Tab. 2 ist zu ersehen, daß die Verwertung von Thiosulfat bei einigen Stämmen vom pH der Nährlösung abhängig war. Es ist denkbar, daß bei niedrigen pH-Werten Tetrathionat, das nicht zu Sulfat oxidiert werden kann, aus Thiosulfat gebildet wird.

C. Assimilatorische Sulfatreduktion und Enzyme des Schwefelstoffwechsels

Außer organischen und anorganischen Verbindungen wurde auch molekularer Wasserstoff als Wasserstoffdonator geprüft.
Ein gutes Wachstum im Licht mit Wasserstoff und Kohlendioxid wurde bei Chromatium Stamm D beobachtet (ROELOFSEN, 1934; HENDLEY, 1955). An diesem Stamm wurde auch die CO_2-Fixierung und der Einbau von radioaktivem Acetat in verschiedene säurelösliche und -unlösliche Fraktionen mit molekularem Wasserstoff untersucht (ARNON et al., 1963). Auch Chromatium vinosum Stamm L verwertet molekularen Wasserstoff (TRÜPER und SCHLEGEL, 1964). Die größeren Formen der Schwefelpurpurbakterien, wie Chromatium warmingii, Chr. weissei, Chr. okenii und Thiospirillum jenense sind nicht in der Lage mit Wasserstoff zu wachsen (TRÜPER und SCHLEGEL, 1964). Bei allen oben zitierten Untersuchungen, mit Ausnahme der von Arnon, ist der Nährlösung Sulfid oder Thiosulfat in geringen Konzentrationen zugesetzt worden. Einige Stämme von Chromatium wachsen mit H_2 und o,o3% Thiosulfat im Nährmedium. Hierbei wird Wasserstoff als Elektronendonator bevorzugt genutzt. Am Versuchsende konnte bei einem Stamm noch Thiosulfat in der Nährlösung nachgewiesen werden (LIPPERT, 1966).
In den vorliegenden Untersuchungen über das Wachstum mit molekularem Wasserstoff wurden organische Schwefelverbindungen, die nicht als Wasserstoffdonatoren dienen, der Nährlösung in geringer Konzentration zugesetzt. Auf den Zusatz reduzierter, anorganischer Verbindungen, wie Sulfid und Thiosulfat, wurde ganz verzichtet und stattdessen zur Reduktion der Nährlösung Ascorbinsäure verwendet. Da Chromatium Stamm 1611 Ascorbat als H-Donator verwertet, ließ sich dieses Reduktionsmittel zur Prüfung von molekularem Wasserstoff als H-Donator bei diesem Stamm nicht verwenden.

Aus den Untersuchungen geht klar hervor, daß die geprüften Stämme mit molekularem Wasserstoff gut wachsen können. Weitere Anhaltspunkte für die Verwertung bei anderen Stämmen konnten bei den Einbauversuchen von ^{35}S in wachsende Zellen mit molekularem Wasserstoff als H-Donator erhalten werden.

da die Nährlösung bei allen bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen immer reduzierte Schwefelverbindungen enthielt, konnte über die assimilatorische Sulfatreduktion bei Thiorhodaceae keine Aussage gemacht werden. HURLBERT und LASCELLES (1963) weisen besonders darauf hin, daß die von ihnen untersuchten Organismen, Chromatium Stamm D und Thiopedia spec., auf reduzierte Schwefelverbindungen, wie Sulfid und Thiosulfat, zur Synthese organischer Schwefelverbindungen angewiesen sind und kein Sulfat reduzieren können. In Experimenten mit ^{35}S-Sulfat konnte bei Chromatium okenii keine Aufnahme von Sulfat nachgewiesen werden (TRÜPER, 1964).

Um so erstaunlicher war das Wachstum einiger unserer Stämme in den Kulturmedien, die Sulfat als einzige Schwefelquelle enthielten. Einen Hinweis auf die Fähigkeit der Thiorhodaceae, Sulfat assimilatorisch zu reduzieren, findet sich bei MULLER (1933).

Die grünen Pflanzen und die meisten Mikroorganismen können reduzierte Schwefelverbindungen, wie Sulfid und Sulfit, durch Reduktion anorganischen Sulfats gewinnen und somit schwefelhaltige Aminosäuren synthetisieren. Die Tiere und einige Bakterien sind zu einer Reduktion des Sulfats nicht befähigt und sind daher auf die Bereitstellung reduzierter Schwefelverbindungen durch andere Organismen angewiesen. Über die assimilatorische Reduktion von Sulfat durch Pflanzen liegen bisher nur wenige Arbeiten vor. Einen Einblick in diese Reduktion erhielt man durch Arbeiten an Mikroorganismen. Aus Hefe, die mit radioaktivem Sulfat gewachsen war, konnte ^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein

nach der Hydrolyse des Proteins mit einem Salzsäure-Ameisensäure-Gemisch durch Chromatographie an Dowex 5o isoliert werden (WOOD und MILLS, 1952).
Diese Aminosäuren wurden auch bei den hier untersuchten Stämmen der Thiorhodaceae in den Eiweißhydrolysaten der radioaktiv markierten Zellen gefunden. Von methodischer Bedeutung war der Befund, daß in den Hydrolysaten Methioninsulfoxid gefunden wurde. Das Verhalten der schwefelhaltigen Aminosäuren gegenüber Oxidationsmitteln wurde zur Identifizierung von Methionin- und Cysteinverbindungen ausgenutzt. Als Standartsubstanz stand ^{35}S-Cystein zur Verfügung.
LOUGHEED und MILAZZO (1965) untersuchten das sulfataktivierende System bei Fomes geotropus. In den beiden ersten Tagen des Wachstums nahm der Sulfatgehalt im Medium stark ab. Die schwefelhaltigen Aminosäuren aus dem mit Wasserstoffperoxid behandelten Eiweißhydrolysat enthielten jedoch nur geringe Radioaktivität. Taurin und Methionin waren am 3. Tag des Wachstums stark radioaktiv markiert. Am 4. Tag erreichte die Markierung von Cyst(e)in und am 8. Tag von Methionin wieder ein Maximum. Die stärkere Markierung von Methionin am Versuchsende wird auf die Bildung aus Cystein zurückgeführt.
Dieser Befund steht mit meinen Beobachtungen im Einklang. Lougheed und Milazzo konnten ferner mit einem Acetonpulver von Fomes meliae eine Synthese von PAPS aus ATP und Sulfat nachweisen und damit den Weg der assimilatorischen Reduktion über dieses Nucleotid wahrscheinlich machen.
Weitere Erkenntnisse über die enzymatischen Vorgänge bei der assimilatorischen Sulfatreduktion erhielt man durch Arbeiten mit Mutanten von Aspergillus. Dieser Pilz scheidet, wenn er in einem Medium mit Sulfat wächst, organisch Schwefelverbindungen aus (RIPPEL und BÆHR, 1936). Sulfit und Thiosulfat wurden als Intermediärprodukte des Einbaus

von Sulfatschwefel in Cystein angesehen (HOCKENHULL, 1949). Bei einer Mutante, die vor Cystein blockiert war, wurde Cysteinthiosulfonat (S.Sulfocystein) angehäuft (NAKAMURA und SATO, 1960).

SHEPHERD (1956) machte zwei Wege der Synthese von Cystein aus Sulfat und Thiosulfat wahrscheinlich. Andere Arbeitsgruppen arbeiteten mit Escherichia, Neurospora und Salmonella.

Über enzymatische Arbeiten an dem sulfataktivierenden System berichteten ROBBINS und LIPMANN (1956) und BANDURSKI et al.,(1956). Die Aktivierung von Sulfat in Hefe umfaßt zwei enzymatische Schritte. Zunächst wird APS aus ATP und Sulfat gebildet, dieses Nucleotid wird dann zu PAPS phosphoryliert. Dieses System wurde in allen bisher untersuchten „assimilatorischen Sulfatreduzierern" gefunden. PAPS ist das Ausgangsprodukt für die Reduktion zu Sulfit.

Ein anderer Weg wurde bei Desulfovibrio desulfuricans, der Sulfat im Zuge einer dissimilatorischen Sulfatreduktion, oder „Sulfat-Atmung", reduziert, gefunden. APS wird bei diesem Organismus direkt durch APS-Reduktase zu Sulfit und AMP reduziert (ISHIMOTO, 1959; PECK, 1960).

Die aeroben Thiobacilli oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen über Sulfit zu APS, von dem Sulfat abgespalten wird. Diese Bakterien enthalten APS-Reduktase und ADP-Sulfurylase, welche die Phosphorylierung von APS zu ADP und Sulfat katalysiert, von hoher spezifischer Aktivität. Bei den hier untersuchten Stämmen der Schwefelpurpurbakterien wurde APS-Reduktase mit hoher spezifischer Aktivität nachgewiesen. Auch die beiden untersuchten Stämme von Chlorobium enthalten dieses Enzym. Die Aktivität von APS-Reduktase liegt bei Thiocapsa, heterotroph mit Fructose und Sulfat gewachsen, wesentlich niedriger. Schon auf Grund dieser Befunde ist zu vermuten, daß die Oxidation von Sulfid zu Sulfat bei den Thiorhodaceae über APS-Reduk-

tase, d.h. von Sulfit ausgehend über APS zu Sulfat, verläuft. Die gefundene Aktivität von ADP-Sulfurylase ist ausreichend, um das Sulfit über die Nucleotidverbindung zu oxidieren, was bilanzmäßig in einer Phosphorylierung von AMP zu ADP zum Ausdruck kommt. Der Nachweis von ATP-Sulfurylase war nicht zufriedenstellend. Es wird vermutet, daß dieses Enzym mit nur einer geringen Aktivität vorliegt. Die Oxidation von Sulfid zu Sulfat würde dann über die durch APS-Reduktase und ADP-Sulfurylase katalysierten Reaktionen laufen. Diese oxidativen Prozesse würden zu einem Gewinn an ADP, nicht aber ATP, führen. Vorerst wurde die Frage nicht geprüft, ob die durch ADP-Sulfurylase katalysierte Reaktion reversibel ist. Bei den Thiobacilli ist sie irreversibel. Es wird vermutet, daß diese Organismen reduzierte Schwefelverbindungen mit Hilfe von APS-Reduktase und ADP-Sulfurylase oxidieren.
Da die hier untersuchten Stämme Sulfatschwefel in die schwefelhaltigen Aminosäuren einbauen können, wurde versucht, das sulfataktivierende System bei diesen Organismen nachzuweisen. Ein direkter Nachweis der ATP-Sulfurylase nach WILSON und BANDURSKI (1958) mit Natriummolybdat an Stelle von Sulfat gelang nicht, da dieser Nachweis durch Adenosintriphosphatase gestört wurde. Kontrollversuche mit einem Rohextrakt aus Desulfovibrio desulfuricans waren positiv. Weitere Untersuchungen zum Nachweis dieser Reaktion sind notwendig. Auf das Vorhandensein von APS-Kinase, die APS zu PAPS phosphoryliert, und PAPS-Reduktase, welche PAPS zu PAP und Sulfit reduziert, wurde nicht geprüft.
Es ist aber zu vermuten, daß die assimilatorische Reduktion von Sulfat bei den Thiorhodaceae nicht wie bei den heterotrophen, assimilatorischen Sulfatreduzierern über PAPS läuft, sondern wie bei Desulfovibrio über APS-Reduktase. Einen Hinweis hierfür kann man dem Befund entnehmen, daß die Aktivität von APS-Reduktase bei Wachstum mit Fructose und Sulfat wesentlich geringer ist.

Den bisher isolierten Thiorhodaceae und Chlorobacteriaceae ist die Fähigkeit zur Sulfidoxidation gemeinsam. Die Oxidation anderer Schwefelverbindungen ist aber nicht allgemein verbreitet.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme können mit extra- und intrazellularem Schwefel wachsen. Ob aber elementarer Schwefel ein Intermediärprodukt des reduktiven oder oxidativen Schwefelstoffwechsels ist, oder nur ein Speicherprodukt, das bei Erschöpfung des H-Donators im Medium aktiviert werden kann, konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Rolle des Thiosulfats im Intermediärstoffwechsel ist sehr umstritten. Nicht alle Schwefelpurpurbakterien und Chlorobacteriaceae vermögen Thiosulfat zu verwerten. Sulfid, Thiosulfat und elementarer Schwefel können von Thiocapsa floridana Stamm 1711, Chromatium Stamm 1211 und Stamm 1611 als Elektronendonator für das Wachstum genutzt werden. An diesen Stämmen wurde die Speicherung und Oxidation des Thiosulfatschwefels mit innen und außen markiertem Thiosulfat untersucht (TRÜPER und PFENNIG, 1966). Es wird eine Spaltung der S-S-Bindung vermutet. Bei Inkubation mit sulphanmarkiertem Thiosulfat wurde ^{35}S in der Zelle gespeichert und anschließend zu Sulfat oxidiert. Mit sulphonmarkiertem Thiosulfat fand keine Speicherung von radioaktivem Intrazellularschwefel statt. Ähnliche Ergebnisse erhielten SMITH und LASCELLES (1966) mit Chromatium Stamm D. Aus diesem Organismus wurde Thiosulfat-Schwefel-Transferase (EC 2.8.1.1., früher: Rhodanese) isoliert, welche mit der Spaltung von Thiosulfat in Zusammenhang gebracht wird. Sulfit, Sulfid und elementarer Schwefel werden als Intermediärprodukte der Thiosulfatoxidation angesehen. Chromatium Stamm 1611 kann Sulfit als Elektronendonator zum Wachstum im Licht nutzen (TRÜPER und PFENNIG, 1966).

V. Zusammenfassung

Es wurden 22 Stämme der Thiorhodaceae auf die Fähigkeit untersucht, verschiedene anorganische und organische Verbindungen als Wasserstoffdonatoren in Gegenwart von Bicarbonat als Kohlenstoffquelle und einer geringen Menge Sulfid als Reduktionsmittel und Schwefelquelle anaerob im Licht zu nutzen.

1) Allen geprüften Stämmen ist die Eigenschaft gemeinsam, mit Sulfid, elementarem Schwefel, Acetat und Pyruvat zu wachsen.
2) Die Säuren des Tricarbonsäurezyklus werden von Chromatium spec., Thiocapsa floridana und einem Thiocystis-Stamm verwertet.
3) Die Fettsäuren können von den meisten Stämmen nicht genutzt werden. Viele Stämme werden insbesondere durch die höheren Fettsäuren im Wachstum gehemmt.
4) Von den Zuckern erwiesen sich nur Glucose und Fructose bei wenigen Stämmen als geeignetes Substrat.
5) Methanol und Äthanol werden nicht verwertet; Propanol wird durch einen Thiocystis-Stamm und Glycerin durch alle Thiocapsa-Stämme genutzt.
6) Mehrere Stämme wachsen mit molekularem Wasserstoff. An den größeren Formen, wie Chromatium weissei und Chromatium okenii, ließ sich weder Hydrogenaseaktivität, noch Wasserstoffverwertung nachweisen.
7) Mit Sulfat als einziger Schwefelquelle konnten Chromatium spec., Thiocapsa floridana und ein Thiocystis-Stamm wachsen.
8) Es wurde der Einbau von radioaktivem Schwefel aus ^{35}S-Sulfat in wachsende Zellen verfolgt. In den Hydrolysaten ^{35}S-markierter Zellen wurde der Sulfatschwefel in den Cystein- und Methioninverbindungen gefunden.

9) Bei den untersuchten Stämmen wurde eine hohe spezifische Aktivität von APS-Reduktase gefunden.

10) ADP-Sulfurylase ist in Extrakten aus Thiocapsa floridana vorhanden. Sie scheint eng mit der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen zu Sulfat verbunden zu sein.

VI. Literaturverzeichnis

ARNON, D.I. 1961 Photoproduction of hydrogen, photo-
LOSADA, M. fixation of nitrogen and unified
NOZAKI, M. concept of photosynthesis.
TAGAWA, K. Nature (Lond.) 190, 601

ARNON, D.I. 1963 Metabolism of photosynthetic bac-
DAS, V.S.R. teria.I. Effect of carbon source
ANDERSON, I.D. and hydrogen gas on biosynthetic
patterns in CHROMATIUM.
Microalgae and Photosynth. Bact.
S. 529

BANDURSKI,R.S. 1956 The mechanism of "active sulfate"
WILSON,L.G. formation.
SQUIRES ,C.L. J. Am. Chem. Soc. 78, 6408

BAVENDAMM,W. 1924 Die farblosen und roten Schwefel-
bakterien des Süß-uund Salzwassers.
Pflanzenforsch. 2, 1

BAXTER,C.F. 1958 Sulfid oxidation in rat tissues.
VAN REEN,R. Biochim. Biophys. Acta 27, 584
PEARSON,P.B.
ROSENBERG,C.

DENT,C.E. 1948 A study of the behavior of some
sixty amino acids.
Biochem. J. 43, 169

ENGELMANN,T.W. 1883 Bacterium photometricum. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Licht- und Farbsinnes. Pflügers Arch. ges. Physiol. 30, 95

FIESKE,C.H.
SUBBAROW,Y. 1925 The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375

FOSTER, J.W. 1942 Alcohol oxidation by photosynthetic purple bacteria. J. Bact. 43, 8

FOSTER,J.W. 1944 Oxidation of alcohols by non-sulfur photosynthetic bacteria. J. Bact. 47, 355

FRIDOVICH,J.
HANDLER,P. 1956 Hypoxanthine as a cofactor for the enzymatic oxidation of sulfite. J. Biol. Chem. 221, 323

GEST,H.
KAMEN,M.D. 1949 Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. IV. Photochemical production of molecular hydrogen be growing cultures of photosynthetic bacteria. J. Bact. 58, 239

GREGORY,I.D. 196o Metabolism of sulfur compounds.
ROBBINS, P.W. Ann. Rev. Biochem. 29, 347

HAIS,J.M. 1963 Handbuch der Papierchromatographie
MAČEK, K. Bd. I. Jena

HEIMBERG,M. 1953 The enzymatic oxidation of sulfite.
FRIDOVICH,I. J. Biol. Chem. 2o4, 913
HANDLER,P.

HENDLEY, D.D. 1955 Endogenous fermentation in Thiorhodaceae.
J. Bact. 7o, 625

HIRSCH,P. 1963 CO_2-Fixierung durch Knallgasbakterien.II. Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsprodukte.
Arch. Mikrobiol. 46, 53

HOCKENHULL,D.J. 1949 The sulfur metabolism of mould fungi.
Biochim. Biophys. Acta 3, 326

HURLBERT,R.E. 1963 Ribulose-di-phosphate carboxylase
LASCELLES,J. in Thiorhodaceae.
J. Gen. Microbiol. 33, 445

ISHIMOTO, M. 1959 Sulfate reduction in cell-free extracts of Desulfovibrio.
J. Biochem.(Tokyo) 46, 1o5

KONDRATJEVA,E.N. 1956 Assimilation of organic compounds by purple bacteria in the light.
Mikrobiologia, 25, 393

KONDRATJEVA,E.N.
PETROVA, L.N. 1963 Assimilation of certain organic compounds by green sulfur bacteria Chloropseudomonas ethylicum.
Nauchnye Doklady Vysshei Shkoly,Biol.Nauki Nr.1

KONDRATJEVA,E.N. 1965 Photosynthetic Bacteria
Moskau 1963
Übersetzung: Jerusalem 1965

LA RIVIERE, J.W.N. 1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers.
Diss. TH Delft

LIPMANN,F. 1958 Biological sulfate activation and transfer.
Science 128, 575

LIPPERT, K.D. 1966 Persönliche Mitteilung

LOUGHEED,G.J.
MILAZZO,F.H. 1965 A study of some aspects of sulfur metabolism in the wood-rotting basidiomycete, Fomes geotropus.
Canad. J. Microbiol. 6, 959

MANTEN,A. 1942 The isolation of Chromatium okenii and its behaviour in different media.
Antonie v. Leeuwenh. 8, 164

METZNER,H. 1962 Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte.
Naturwissensch. 49, 183

MULLER,F.M. 1933 On the metabolism of the purple-sulfurbacteria in organic media.
Arch. Mikrobiol. 4, 131

NAKAMURA,H. 1939 Weitere Untersuchungen über den Wasserstoffumsatz bei den Purpurbakterien.
Acta Phytochim.(Japan) 11, 109

NAKAMURA,T. 1960 Cysteine-S-sulphonate as an intermediate in microbial synthesis of cysteine.
Nature (Lond.) 185, 163

NEFELOVA,M.V. 1959 Assimilation of organic substances by photosynthetic bacteria of the thiorhodaceae group.
ND Vysshei Shkoly, Biol. Nauki Nr.1

NIEL, C.B. van 1932 On the morphology und physiology of the purple and green sulphur bacteria
Arch. Mikrobiol. 3, 1

NIEL,C.B. van 1936 On the metabolism of the Thiorhodaceae.
Arch. Mikrobiol. 7, 323

NIEL, C.B. van 1941 The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis.
Advanc. Enzym. 1 263

NIEL, C.B. van 1944 The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur-purple and brown bacteria.
Bact. Rev. 8, 1

OSNITSKAYA,L.K. 1958 Assimilation of organic compounds by photosynthetic purple sulfur bacteria from lake Beloe.
Mikrobiologia, 27, 665

PECK,H.D. 1960 APS as an intermediate in the oxidation of thiosulfate by Thiobacillus thioparus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1053

PECK,H.D. 1960 Evidence for oxidative phosphorylation during the reduction of sulfate with hydrogen by Desulfovibrio desulfuricans.
J. Biol. Chem. 235, 2734

PECK,H.D. 1962 Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms. Bact. Rev. 26, 67

PECK,H.D.
DEACON,T.E.
DAVIDSON,J.T. 1965 Studies on adenosine-5-phosphosulfate reductase from Desulfovibrio desulfuricans and Thiobacillus thioparus. Biochim. Biophys. Acta 96, 429

PETROVA,E.A. 1959 Sources of nitrogen nutrition for purple sulfur bacteria. Doklady AN SSSR Vol. 126, Nr.5

PFENNIG,N. 1961 Eine vollsynthetische Nährlösung zur selektiven Anreicherung einiger Schwefelpurpurbakterien. Naturwissensch. 48, 136

PFENNIG,N. 1965 Anreicherungskultur für rote und grüne Schwefelbakterien. in: Anreicherungskultur und Mutantenauslese. Zentralbl. Bakt.,Paras.,Inf. u. Hyg. I. Abt. Supplementh. 1 S. 179 u. 503

RIPPEL,A.
BEHR,G. 1936 Über die Entgiftung von Schwefelsäure in Kulturen von Aspergillus niger. Arch. Mikrobiol. 7, 584

ROBBINS,P.W. 1956 The enzymatic sequence in the bio-
LIPMANN,F. synthesis of active sulfate.
J. Am. Chem. Soc. 78, 6409

ROBBINS,P.W. 1958 Enzymatic synthesis of APS.
LIPMANN,F. J. Biol. Chem. 233, 686

ROELOFSEN,P.A. 1934 On the metabolism of the purple
sulfur bacteria.
Proc. Kon. ned. Acad. Wet. 37,660

SCHLEGEL,H.G. 1961 Radioaktivitätsmessung an Ein-
LAFFERTY,R.M. zellern auf Membranfiltern.
Arch. Mikrobiol. 38, 52

SCHMIDT,K. 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
LIAAEN JENSEN,S. I. Okenon als Hauptcarotinoid von
SCHLEGEL,H.G. Chromatium okenii Perty.
Arch. Mikrobiol. 46, 117

SCHMIDT,K. 1965 Carotenoids of Thiorhodaceae
PFENNIG,N. IV. The carotenoid composition
LIAAEN JENSEN,S. of 25 pur isolates.
Arch. Mikrobiol. 52, 132

SCHRAM 1954 Chromatographic determinations of
MORE cystein and cysteic acid.
BIGWOOD Biochem. J. 57, 33

SCHWARTZ,W. 1958 Die Schwefelspezialisten unter den
Mikroorganismen. in: Handb. Pflan-
zenphysiol. 9, 89, Berlin,Göttingen

SHEPHERD,C.J. 1956 Pathways of cysteine synthesis in Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol. 15, 29

SMITH,A.J. 1966 The role of tetrathionate in the oxidation of thiosulphate by Chromatium sp. strain D. J. Gen. Microbiol. 42, 371

SMITH,A.J. LASCELLES,J. 1966 Thiosulphate metabolism and rhodanese in Chromatium sp. strain D. J. Gen. Microbiol. 42, 357

STAHL,E. 1962 Dünnschicht-Chromatographie Berlin, Göttingen

TAYLOR,J.J. 1958 Thiorhodaceae.I. The effects of sodium thioglycolate on the photosynthetic and dark metabolism of purple sulphur bacteria. Canad. J. Microb. 4, 425

TRÜPER,H.G. 1964 CO_2-Fixierung und Intermediärstoffwechsel bei Chromatium okenii Perty. Diss. Univers. Göttingen

TRÜPER,H.G. 1964 Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of Cromatium okenii. Antonie v. Leeuwenh. 30,225

TRÜPER,H.G. PFENNIG,N. 1966 Sulphur metabolism in Thiorhodaceae III. Storage and turnover of thiosulphate sulphur in Thiocapsa floridana and Chromatium species. Antonie v. Leeuwenh. 32, 261

WILSON,LG. 1962 Metabolism of sulfate: Sulfate reduction. Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 201

WILSON,L.G. BANDURSKI,R.S. 1958 Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate, and molybdate. J. Biol. Chem. 233, 975

WINOGRADSKY,S.N. Die Schwefelbakterien 1887 Bot. Zs. 45, 489

WINOGRADSKY,S.N. Beiträge zur Morphologie und 1888 Physiologie der Bakterien. S. 1, Leipzig

WOOD,J.L. 1952 Preparation of methionine-S^{35} and cysteine-S^{35} from radioactive yeast. J. Am. Chem. Soc. 74, 2445

VII. Anhang

1) Anzucht von Desulfovibrio desulfuricans

Für die Kultivierung von Desulfovibrio desulfuricans wurde folgende Nährlösung gewählt:

Na_2SO_4	o,35 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	o,35 g
NH_4Cl	o,25 g
K_2HPO_4	o,13 g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	o,o25 g
EDTA	2,5 mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	2,o mg
Hefeextrakt	o,1o g
Na-Lactat (5o%ig)	2,o ml
aqua dest.	5oo ml
pH	7,8

Die Nährlösung wurde in Schraubverschlußflaschen bei 121^{o} im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlung war die Lösung gebrauchsfertig.
Während des Wachstums der Organismen entstand nur eine sehr geringe Menge Eisensulfid, das beim Ernten der Kulturen nicht störte.

2) Anzucht von Aspergillus oryzae

Für die Kultivierung von Aspergillus oryzae wurde folgende Nährlösung verwendet:

Biomalz mit Eisenzusatz	2o g
Leitungswasser	1.ooo ml
pH	6,5

Die Nährlösung wurde in flachen Pilzkulturgefäßen bei 121° im Autoklaven sterilisiert.

3) Herstellung eines zellfreien Extraktes aus Aspergillus oryzae

Die Nährlösung wurde dekantiert, das Mycel mehrmals mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gewaschen, danach mit Quarzsand im Mörser zerrieben und in Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand dialysiert und als Rohextrakt verwendet.

4) Nachweis von Pyrophosphatase in einem Rohextrakt

Rohextrakte aus Aspergillus oryzae wurden auf Pyrophosphataseaktivität geprüft. Die Werte sind in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1

Bestimmung von anorganischem Phosphat aus Pyrophosphat mit einem Rohextrakt aus Aspergillus oryzae

System	Extinktion	Bildung von PO_4 (µmol/ml)	
komplett	o,521	5,6	3,7[1]
minus $P_2O_7^{4-}$	o,131	1,4	
minus Extrakt	o,o5o	o,5	
minus Extrakt[2] (mit HCl hydr.)	o,456	4,8	
Extrakt inakt.	o,168	1,8	

Der komplette Ansatz enthielt:

3oo µmol Tris-Puffer ph=7,4; 4o µmol $MgCl_2$; 6 µmol $P_2O_7^{4-}$;;Endvolumen 3,o ml

1) Wert nach Abzug des Phosphatgehaltes von Extrakt und Pyrophosphat.
2) Pyrophosphat wurde durch 1N HCl im kochenden Wasserbad hydrolysiert.

	Chr. oken. St.1811	Chr. weissei St.1812	Chr.weissei St.6211	Chr. warm. St.6512	Chr.warm. St.1311	Chr.spec. St.1211	Rhodoth.p. St.1314	Rhodoth.c. St.6611	Thiocystis St.6111	Thiocystis St.2311	Thiocapsa St.1813	Thiocapsa St.1711	Thiopedia St.Lasc.	Chromatium St.6412	Chromatium St. D	Chromatium St.1611
Sulfid,Schwefel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetat	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thiosulfat	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Malat	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Succinat,Fumarat	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
casamino acids	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Glucose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Ketoglutarat	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Glycerin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Citrat,Ascorbat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Methanol,Äthanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propanol,Tartrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose,Gluconat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	h	-	-	-	-
Propionat	+	+	h	+	+	+	+	h	h	h	h	h	+	h	+	+
Lactat	+	+	-	+	+	+	+	h	h	h	h	h	+	h	+	+
Crotonat	+	h	-	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
Thioglycolat	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
Glycolat	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h

		Chromatium St. 1611	Chromatium St. 2811	Chromatium St.D(intern.)	Chromatium St. 6412	Chromatium St. 6411	Thiopedia St.Lascelles	Thiocapsa St. 1711	Thiocapsa St. 6311	Thiocapsa St. 1813	Thiocapsa St. 6612	Thiocystis St. 1313
1	**Sulfid**	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k
2	Thiosulfat 7,4		+	+	+	+						
	Thiosulfat 6,9	+	-	-	-	+	++	++	++	+	+	-
3	Schwefel	+	++	+	+	++	+	++	+	+	+	++
4	Thiocyanat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Thioglycolat	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	H	(H)	-
6	Methanol	-	(H)	-	-	-	-	(H)	(H)	(H)	(H)	-
7	Äthanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Glycerin	-	-	-	-	-	++	+	++	+	+	-
1o	Mannit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12	Fructose	++	-	-	-	-	++	+	++	++	+	-
13	Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Gluconat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
15	Ascorbat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Pepton	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)	-	-	(+)	-
17	casam.acids	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-	-	(+)	-
18	Glutamat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Pyruvat	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+
2o	Acetat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
21	Butyrat	++	(H)	-	-	-	-	(H)	-	-	HH	H
22	Crotonat	++	H	H	-	-	H	HH	HH	H	HH	-
23	Propionat	++	HH	+	HH	HH	++	HH	H	(H)	HH	HH
24	Lactat	++	HH	(+)	-	H	++	HH	HH	H	HH	H
25	Tartrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Benzoat	-	HH	-	HH	-	H	HH	HH	(H)	-	-
27	Glycolat	HH	HH	H	(H)	H	HH	HH	HH	H	HH	H
28	Formiat	HH	+	+	H	H	HH	HH	HH	H	HH	-
29	Malat	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	-
3o	Succinat	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	-
31	Fumarat	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	-
32	Ketoglutarat	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
33	Citrat	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Harnstoff	H	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
35	Nitrat	H	-	(H)	-	-	-	-	-	(H)	H	(H)
36	Stickst.-frei	-	-	H	-	-	HH	-	-	-	HH	-
37	Vit.B12-frei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Hydrogenase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4o	Nitratred.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	Sulfatred.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

		Thiocystis St. 2311	Thiocystis St. 6111	Thiocystis St. 2711	Chromatium St. 1211	Chromatium St. 1312	Rhodoth.pend. St. 1314	Rhodoth.consp. St. 6611	Chromatium St. 1311	Chr.warmingii St. 1113	Chr.warmingii St. 6512	Chr.weissei St. 1812	Chr. weissei St. 6211	Chr. okenii St. 1811	
1		k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k
2		++	(+)	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
3		++	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	
4		-	-	-	-	-	-	-	(H)	-	-	-	-	H	
5		HH	HH	HH	H	HH	HH	H	HH	HH	HH	HH	HH	HH	
6		H	-	-	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	H	(H)	-	-	(H)	
7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1o		++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11		+	++	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
12		-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14		-	(H)	-	-	-	HH	-	-	-	-	-	(H)	H	
15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16		HH	+	-	(+)	HH	-	(+)	+	-	-	-	-	-	
17		+	-	-	+	-	H	(H)	-	-	-	-	-	-	
18		-	-	-	-	-	-	(H)	-	-	-	-	-	-	
19		++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	++	++	+	
2o		+	++	++	+	H	+	++	++	++	++	+	++	++	
21		H	-	+	H	H	HH	-	(H)	H	H	H	H	HH	
22		HH	H	++	H	HH	HH	(H)	HH	(H)	H	(H)	(H)	HH	
23		HH	H	++	H	HH	HH	H	HH	H	H	(H)	(H)	(H)	
24		HH	HH	HH	H	HH	HH	H	HH	HH	HH	HH	HH	HH	
25		-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26		HH	HH	-	H	HH	HH	-	(H)	-	(H)	-	HH	HH	
27		HH	HH	HH	H	HH	HH	H	HH	HH	H	HH	H	HH	
28		HH	(H)	(+)	H	HH	-	(H)	HH	(+)	HH	(H)	H	-	
29		(+)	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3o		+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32		+	+	-	-	-	-	-	-	(H)	(H)	-	-	-	
33		-	-	-	-	-	-	H	(H)	-	-	-	-	-	
34		-	-	-	-	HH	-	-	H	-	-	(H)	-	H	
35		-	H	-	H	HH	H	H	H	H	(H)	H	H	H	
36		(H)	-	-	HH	HH	H	H	H	HH	HH	HH	H	H	
37		-	-	-	-	H	-	-	H	H	H	H	H	H	
38		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
39		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
4o+		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
41		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel für die Überlassung des Themas und für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit danken.
Herrn Prof. Dr. N. Pfennig danke ich für die Überlassung der Thiorhodaceen-Stämme und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 7.6. 1938 wurde ich, Hans Hermann Berthold Thiele, als erster Sohn der Eheleute Hermann Thiele, geboren am 11.2. 1913, und Elisabeth Thiele, geborene Bosserhoff, geboren am 31.1o.1912, in Dinslaken geboren und evangelisch getauft. Während des Krieges wurden meine Mutter, mein Bruder und ich nach Moischeid im Kreis Ziegenhain evakuiert. Dort wurde ich im Herbst 1944 eingeschult. Am 3o.4.1945 kam ich in das 2. Schuljahr an der Pestalozzi-Schule in Dinslaken. Ostern 1949, nach 41/2 Volksschuljahren, wurde ich in die Sexta des math.-naturw. Gymnasiums in Dinslaken aufgenommen.

Am 25.2.1958 wurde ich mit dem Zeugnis der Reife von dieser Schule entlassen und schrieb mich zum SS 1958 an der Pädagogischen Akademie in Wuppertal ein. Zum WS 1958/59 wechselte ich zur Philipps-Universität Marburg und schrieb mich dort in der Philosophischen Fakultät ein. Ich belegte die Fächer: Biologie, Physik, Chemie und Mathematik. Am 31.1o.196o immatrikulierte ich mich in der math.-naturw. Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. Nach sieben naturwissenschaftlichen Fachsemestern bestand ich am 12.4.1962 den Prüfungsabschnitt A für das Lehramt an Mittelschulen in den Fächern: Biologie, Chemie und Physik. Im SS 1962 und WS 1962/63 war ich an der Pädagogischen Hochschule Göttingen im Institut zur Ausbildung von Mittelschullehrern immatrikuliert. Am 25.2.1963 bestand ich den Prüfungsabschnitt B des Mittelschullehrerexamens. Im SS 1963 schrieb ich mich wieder an der Georg-August-Universität ein. Im April 1964 begann ich am Institut für Mikrobiologie der Universität mit den Versuchen zur Dissertation.